

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DES SCIENCES

LES LIPIDES DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier
pour obtenir le grade de
Docteur-ingénieur

par

Farrokh CHERKAT

Ingénieur agronome

soutenue le 22 Juin 1967 devant la Commission d'examen

JURY :

M. E. KAHANE

Président

M. P. JAULMES

Assesseurs

M^{me} H. COLSON-GUASTALLA

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DES SCIENCES

LES LIPIDES DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier

pour obtenir le grade de

Docteur-ingénieur

par

Farrokh CHERKAT

Ingénieur agronome

soutenue le 22 Juin 1967 devant la Commission d'examen

JURY :

M. E. KAHANE

Président

M. P. JAULMES

} Assesseurs

M^{me} H. COLSON-GUASTALLA



FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

LISTE DES PROFESSEURS

DOYEN : A. CASADEVALL

ASSESSEURS : M. SAUVAGE
M. DUMONTET

DOYEN HONORAIRE : P. MATHIAS

PROFESSEURS HONORAIRES : R. JACQUES J. SOULA
M. CASTERAS G. DENIZOT
E. CARRIERE J. GRANIER
E. TURRIERE Ch. BOUHET

PROFESSEURS TITULAIRES :

M. M. MOUSSERON	Chimie organique
M. L. EMBERGER	Botanique
M. J.P. ROIG	Physique
M. P. CHATELAIN	Minéralogie et Cristallographie
Mlle O. TUZET	Zoologie
Mlle G. CAUQUIL	Chimie organique
M. G. COUCHET	Mécanique supérieure
M. J. SALVINIEN	Chimie - Physique
Mlle A.M. VERGNOUX	Physique
M. J. AVIAS	Géologie
M. P. VIELES	Chimie
M. J. RABINOVITCH	Physique (C.S.U.P.)
M. E. KAHANE	Chimie biologique
M. J.J. MOREAU	Mécanique rationnelle
M. B. CHARLES	Mathématiques pures
M. J. MOTTE	Biologie végétale
M. R. JOUTY	Physique
M. P. DUMONTET	Physique
M. R. LEGENDRE	Zoologie
M. I. ASSENMACHER	Physiologie animale
M. A. CASADEVALL	Chimie organique

M. B. PISTOULET.....	Physique
M. Ch. ROUMIEU.....	Analyse supérieure
M. J. ROBIN.....	Physique
M. A. POTIER.....	Chimie minérale
M. R. LAFONT.....	Physique
M. R. JACQUIER.....	Chimie
M. J. FALGUEIRETTES.....	Minéralogie
M. J. RÉGNIER.....	Chimie
Mme J. CHARLES.....	Mathématiques
M. P. CAILLON.....	Physique
M. J. ROUZAUD.....	Chimie
M. Ch. SAUVAGE.....	Botanique
M. H. CHRISTOL.....	Chimie (E.N.S.I.)
M. A. MARTINEAU.....	Mathématiques
Mme G. VERNET.....	Biologie animale
M. L. CECCHI.....	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

Mme M. L. de POUQUES.....	Botanique (C.S.U. P.)
M. P. MURAOUR.....	Géophysique appliquée
Mme M. LAFON.....	Mathématiques
M. M. MATTAUER.....	Géologie
M. G. TOURNE.....	Chimie
M. L. EUZET.....	Zoologie (C.S.U. P.)
M. J. REMY.....	Géologie
M. H. ANDRILLAT.....	Astronomie
M. P. DEMANGEON.....	Géologie
M. A. BONNET.....	Botanique
M. M. SAVELLI.....	Physique
M. G. DELOUPY.....	Physique
Mme S. ROBIN.....	Physique
M. L. GRAMBAST.....	Botanique
M. J.P. LAFON.....	Mathématiques
Mme Ch. DUBOUL-RAZAVET.....	Géologie (C.S.U. P.)
M. E. GROUBERT.....	Physique
Mme H. GUASTALLA.....	Biologie physico-chimique

MAITRES DE CONFÉRENCES :

M. G. LAMATY	Chimie
M. R. GAUFRES	Chimie
M. F. PROUST	Géologie
M. A. BASSOMPIERE	Physique
M. R. MARTY	Psycho-physiologie
M. M. MAURIN	Chimie
M. J.J. SOULIER	Chimie (C.S.U. P.)
M. J. PARIS	Zoologie
Mlle A. BAILLETTE	Mathématiques (C.S.U. P.)
M. P. MOLINO	Mathématiques
M. N. ROBY	Mathématiques (C.S.U. P.)
Mme PARIS-PIREYRE	Physiologie végétale
M. G. BOUGNOT	Physique
M. Y. GUITTON	Physiologie végétale (C.S.U. P.)
M. F. BOMBRE	Physique (C.S.U. P.)
M. C. PUISSEGUR	Biologie animale (C.S.U. P.)
M. P. VIALLET	Chimie (C.S.U. P.)
M. L. THALER	Géologie
N.....	Mathématiques (M. BOUIX)

CHARGES D'ENSEIGNEMENT :

M. M. LEFRANC	Mathématiques
M. A. STURER	Mathématiques
M. J. LEGRAND	Physiologie animale

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE.

A MA MÈRE.

En témoignage de reconnaissance et
respectueuse affection.

A CHAHLA.

A TOUS LES MIENS.

A MES AMIS.

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE.

MONSIEUR LE PROFESSEUR Ernest KAHANE

Professeur de Chimie Biologique

à la Faculté des Sciences de Montpellier.

AVANT-PROPOS

Je suis très heureux de pouvoir adresser ici ma respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur Ernest KAHANE qui m'a fait l'honneur de m'accepter parmi ses chercheurs, et de me permettre de réaliser ce travail. Je ne saurai dire combien, lors de mon arrivée à Montpellier, et en plusieurs occasions difficiles, j'ai été touché par sa grande compréhension à mon égard. Mon travail en a été grandement facilité, le rayonnement de sa forte personnalité sera toujours pour moi un exemple. Je le remercie pour toutes les connaissances que j'ai pu acquérir dans son Laboratoire.

Je remercie Monsieur le Professeur JAULMES, Professeur titulaire à la Faculté de Pharmacie, de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Mes remerciements vont également à Madame H. COLSON-GUASTALLA, Professeur sans chaire, pour avoir bien voulu accepter de faire partie de ce Jury.

Que tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation technique et dans l'impression de cette thèse trouvent ici l'expression de mes remerciements.

Je sais gré à tous mes camarades de Laboratoire de l'atmosphère de cordialité et de bonne humeur qui a rendu agréable l'accomplissement de ce travail.

Ma reconnaissance va à la Société des Caves de Roquefort et surtout à Monsieur BRET; de même qu'au Laboratoire Lyocentre à Aurillac et à son Directeur Monsieur DELZONS; et les Fromageries des Gorges du Tarn à Rodez pour les stages effectués et les matériels qu'ils ont bien voulu nous fournir.

Ma reconnaissance va aussi à l'Institut Appert et à son Directeur Monsieur DUROCHER. J'ai acquis des connaissances précieuses en suivant les cours supérieurs de l'Ecole Technique de la Conserve.

Je remercie Monsieur DESIRANT, Directeur du Laboratoire des Fermiers réunis à Paris, pour ses précieux conseils lors d'une visite à son Laboratoire.

Je suis reconnaissant aux Etablissements Proseca pour le matériel fourni.

Finalement, ma reconnaissance va à l'Organisation de Coopération technique Franco-Iranienne pour la bourse attribuée qui m'a ainsi donné les moyens matériels de réaliser ce travail.

INTRODUCTION

La matière grasse du lait est en grande majorité sous forme d'émulsion de globules gras. Le diamètre des globules gras du lait de vache varie dans de très larges limites : de 0,1 à 10 microns. La majorité des globules gras du lait entier (83 %) se situe de 1 à 5 microns. Dans le lait écrémé ne subsistent que les globules gras, les plus petits, ceux qui ont le plus facilement échappé à l'action de la force centrifuge. C'est une émulsion stable du type "huile dans l'eau". La surface des globules gras est couverte par une couche adsorbée communément dénommée "membrane de globule gras". Cette membrane contient des phospholipides et des protéines sous forme d'un complexe.

En plus de son rôle de stabilisation de l'émulsion de la matière grasse, le complexe de phospholipides - protéines joue un rôle important dans de nombreux procédés et problèmes relatifs au lait et à ses dérivés.

Une faible partie des lipides se trouve dans le sérum du lait, probablement combiné aux protéines. Donc, les lipides du lait se trouvent dans trois phases nettement différentes, à savoir : les globules gras, la membrane entourant ces globules, et le sérum du lait.

Le tableau I représente les différents constituants des lipides du lait, leurs taux et leur disposition dans le lait, suivant les trois catégories mentionnées.

TABLEAU I

Les lipides du lait (D'après JENNES R. & PATTON S. - 32)

CONSTITUANTS	TENEURS	SITUATION dans le LAIT
TRIGLYCÉRIDES (*)	98 - 99%	globules gras
PHOSPHOLIPIDES (**) (lécithines, céphalines, sphingomyéline)	0,2 - 1,0%	membrane globulaire et le sérum
STÉROLS (*) (cholestérol, lanostérol)	0,25-0,40%	globules gras, membrane globulaire et le sérum
ACIDES GRAS LIBRES	traces	globules gras et sérum
CIRES	traces	globules gras
SQUALÈNE	traces	globules gras
VITAMINES LIPOSOLUBLES	40 à 60 μ g	globules gras
VITAMINE A	7,0 - 8,5 μ g / g lipides	
CAROTÉNOÏDES	8,0 - 10,0 μ g / g lipides	
VITAMINE E (tocophérol)	2 - 50 μ g / g lipides	
VITAMINE D	traces	
VITAMINE K	traces	

(*) basées sur le poids total des lipides.

(**) calculés comme lécithine sur la base de phosphore lipidique.

Les résultats signalés dans la littérature pour la teneur en phospholipides du lait et de ses produits, montrent un taux de variation très vaste. Il semble cependant que la plupart de ces variations soient dues à des différences dans

les méthodes d'extraction et plus particulièrement dans l'utilisation des différents solvants.

o

o o

Nous nous sommes donc proposé d'entreprendre l'étude des méthodes classiques d'extraction des lipides, tout en essayant d'adapter une nouvelle méthode azéotropique (à chaud et à froid) mise au point dans notre laboratoire. Au premier abord, la meilleure méthode sera celle qui extraira la plus grande quantité de lipides purs avec le maximum de phosphore lipidique par rapport aux autres méthodes.

N'ayant pas à notre disposition de lait frais de vache, nous avons commencé notre étude par l'extraction des lipides du lait en poudre (à taux variable de matière grasse). Nous l'avons continuée par l'étude du lait stérilisé du commerce et du lait concentré sucré, et complétée par la comparaison de l'efficacité des différentes méthodes pour l'extraction des lipides du fromage de Roquefort.

Dans le fromage de Roquefort, malgré la protéolyse très poussée (50 % de caséine est dégradée), la lipolyse ne dégrade que 1 à 3 % des lipides totaux. Cependant, les produits de dégradation ont une forte influence sur le goût et l'arôme du fromage.

o

o o

Dans ce travail, nous étudierons le sort des phospholipides au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort, peu étudié jusqu'à l'heure actuelle. En effet, les phospholipides étant en relation avec les

qualités organoleptiques des produits, il serait intéressant de montrer la différence entre leur état primitif dans le lait de brebis, et leur état final dans le fromage.

Après un rapide coup d'œil sur la fabrication du fromage de Roquefort, nous étudions les lipides de chaque constituant entrant dans la fabrication de ce fromage par les méthodes chromatographiques. Nous examinons également le sort de chacun de ces lipides après l'affinage.

Enfin, nous avons brièvement esquissé une étude dynamique de la dégradation des phospholipides du lait sous l'influence des agents bactériens, et formulé une hypothèse pouvant interpréter les résultats obtenus.

P R E M I È R E P A R T I E

E X T R A C T I O N Q U A N T I T A T I V E

CHAPITRE I

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

A. MATÉRIEL UTILISÉ

- Lait en poudre - Différentes sortes de lait en poudre (lait enrichi à 28 % de M.G., lait semi écrémé 12 % et lait écrémé 0,7 %) sont utilisées pour l'étude quantitative des procédés d'extraction des lipides.

- Lait stérilisé homogénéisé du commerce, vendu en bouteilles de 500 ml et 1 litre, utilisé pour l'étude quantitative et qualitative.

- Fromage de Roquefort qui, ainsi que l'échantillon de caillé frais et un échantillon de lait frais de brebis, a été fourni quelquefois par la Société des Caves de Roquefort, mais plus souvent le fromage de Roquefort est celui du commerce livré en emballage triangulaire de 150 à 200 g, destiné à de petites consommations.

- Poudre de Penicillium roquefortii, fournie également par le laboratoire de la Société des Caves de Roquefort.

- Ferment lactique - Sous ses différentes formes : poudre lyophilisée et liquide, il nous a été fourni par la Société Proseca (poudre et culture

liquide constituées en majeure partie de *Streptococcus lactis*) et par le laboratoire Lyocentre d'Aurillac (poudre lyophilisée de *lacto-bacillus acidophilus*).

B. MÉTHODES D'EXTRACTION DES LIPIDES

L'extraction des lipides du lait et de ses produits a été faite par des procédés différents, et c'est l'étude comparative de ces procédés qui nous aidera à choisir la méthode la plus efficace pour notre étude qualitative.

1° Méthode de Röse-Gottlieb (45, 46, et 57)

En milieu ammoniacal et en présence d'alcool, la matière grasse est extraite à deux reprises par l'éther éthylique et l'éther de pétrole. Après déshydratation par passage sur le sulfate de sodium anhydre, les couches éthero-alcooliques réunies sont évaporées à sec, et le résidu de matière grasse est pesé. Deux extractions sont nécessaires.

2° Norme internationale F. I. L. n° 5 (29)

(F.I.L. : Fédération Internationale des Laiteries)

La méthode de Röse - Gottlieb, n'étant pas applicable dans le cas des fromages en raison de l'acidité plus ou moins élevée de ceux-ci, nous avons eu recours à la méthode F.I.L. n° 5, qui a été adoptée pour les mêmes conditions.

Cette méthode est exactement semblable à la précédente, avec la seule différence que l'extraction se fait après la digestion de l'échantillon de fromage (3 g environ), dans 10 ml d'acide chlorhydrique à 25 % ($d = 1,125$), la suite de l'opération est conduite comme précédemment. (Pour le détail voir CHAPITRE **IV**)

3° Méthode de Folch (15)

Elle consiste en un épuisement par un mélange de chloroforme méthanol 3/1 (V/V).

4° Méthode de Kumagawa (30)

Epuisement continu de l'échantillon à l'éthanol bouillant pendant 8 heures.

Les échantillons secs ont été réhydratés par de l'eau distillée à raison de 10 ml / g de matériel sec.

5° Méthode azéotropique (26)

Le principe de ce procédé d'extraction reposant sur la distillation du mélange azéotropique benzène - alcool - eau a été donné lors d'une communication de E. KAHANE et S. ROUS au "Symposium sur les problèmes biochimiques des lipides" de Marseille, en Juillet 1960. (26 bis) (Fig. 1)

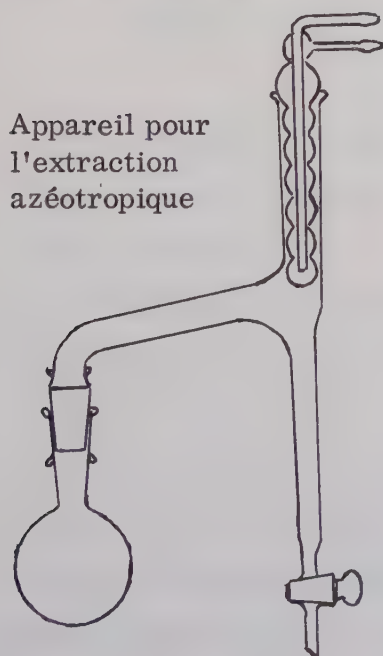


Fig. 1

La déshydratation et l'extraction s'effectuent en même temps.

Le mélange d'extraction a pour composition :

- 10 ml d'eau distillée
- 50 ml d'alcool éthylique
- 200 ml de benzène

L'eau sert à la réhydratation des échantillons secs (lait en poudre) ou presque secs (fromage). Dans le cas du lait entier, le matériel est considéré comme suffisamment hydraté.

Pour éliminer un volume de 10 ml d'eau, la durée d'entraînement est d'une heure;

après l'élimination de l'eau, les lipides sont en solution alcool-benzénique, que l'on filtre. On chasse ensuite le solvant dans l'évaporateur rotatif sous pression réduite et à moins de 50° C.

On reprend le résidu au chloroforme. La solution chloroformique est alors filtrée sur papier Durieux sans graisse, recueillie dans une capsule tarée, évaporée au bain-marie ou sur plaque chauffante. L'extrait lipidique est enfin pesé (après avoir été desséché à l'étuve à 100° C, et refroidi) au dixième de mg près, et forme l'extrait lipidique brut.

6° Méthode de Kumagawa modifiée (3)

Etant basée sur le même principe que le Kumagawa classique, cette méthode n'en diffère que par son mélange de solvants qui est le mélange de l'extraction azéotropique benzène - alcool - eau, dans les proportions 100 - 25 - 5 ml.

7° Extraction des lipides par un nouveau procédé à froid (3)

Nous avons constaté que la prolongation de l'ébullition dans les solvants, à elle seule, n'améliore guère le rendement de l'extraction; elle accroît par contre le risque de dégradation des lipides.

D'autre part, il semble que l'extraction soit fonction de l'affinité des divers groupes lipidiques de la substance à traiter pour chacun des solvants utilisés.

Ceci a conduit Maryse ARIZZI (3) à imaginer un procédé dans lequel tout le solvant de départ se retrouverait en fin d'opération, permettant ainsi d'élargir la gamme de polarité du mélange extractif et d'améliorer le rendement d'extraction des lipides polaires (phospholipides par exemple). De plus,

comme l'opération est effectuée à froid avec le mélange benzène - alcool - eau, la dégradation thermique éventuelle des lipides est empêchée. L'extraction sera facilitée par une simple agitation magnétique ou mécanique (appareil à secousse) permettant le renouvellement du contact entre le matériel traité et le mélange de solvants. La constitution du mélange solvant est identique à celle de l'extraction azéotropique à chaud.

A la fin de l'opération, le résidu est séparé par filtration du mélange extractif, et éliminé. Le mélange extractif se partage, après décantation de quelques heures, en deux phases : l'une supérieure alcoolo-benzénique chargée de lipides peu polaires, l'autre inférieure hydro-alcoolique chargée en lipides plus polaires. La suite de l'opération est identique à l'extraction azéotropique.

C. PURIFICATION DES LIPIDES

Le résidu lipidique résultant de l'évaporation sous vide des liquides d'extraction est repris par le chloroforme. On évapore le solvant au bain-marie puis à l'étuve à $100^{\circ} - 110^{\circ} \text{C}$. Il n'est pas pur, nous l'appelons : extrait lipidique brut.

Après pesée, il est purifié par la méthode de Folch (15) dans le mélange biphasique chloroforme - méthanol - eau en proportions rigoureuses (8 / 4 / 3 V / V). Le chloroforme, le méthanol et l'eau sont ajoutés successivement. Le mélange se sépare en deux phases que l'on laisse décanter pendant 12 heures environ. La phase inférieure $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$ est ensuite recueillie dans un flacon taré et évaporée au bain-marie jusqu'à poids constant. La phase supérieure $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ évaporée, est également reprise par du chloroforme pour récupérer les lipides qu'elle aurait pu retenir.

Nous effectuons le plus souvent la "double purification" ou le "lavage croisé" (20) : on laisse décanter parallèlement les mêmes quantités des mêmes solvants purs; dans un deuxième temps, la phase chloroformique lipidique est lavée avec la phase hydrométhanolique pure, et la phase hydrométhanolique lipidique par la phase chloroformique pure. Après de nouvelles décantations l'extrait lipidique purifié est obtenu par l'évaporation des phases inférieures chloroformiques réunies.

Nous avons aussi effectué un lavage des parois des ampoules à décantation avec un mélange de CHCl_3 — CH_3OH 2/1 V/V pour récupérer les traces des lipides restant éventuellement adhérentes.

D. FRACTIONNEMENT DES LIPIDES

1° Chromatographie sur colonne

Les lipides sont fractionnés sur colonne d'acide silicique selon le protocole décrit par M. MARINETTI (33).

Nous utilisons un tube de 3 cm de diamètre muni d'un verre fritté ou d'une couche de sable à la partie inférieure. Le tube est garni de 14 g d'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) introduit en suspension dans du chloroforme et dégazé sous pression réduite. L'adsorbant est successivement activé par 100 ml de chloroforme - méthanol 1/1 V/V et lavé par 50 ml de chloroforme. 50 à 60 mg de lipides en solution dans 5 ml de chloroforme sont introduits dans la colonne. Après écoulement, les parois sont rincées avec 2 ml de chloroforme.

Les lipides neutres sont élués par 50 ml de chloroforme. Les phospholipides sont fractionnés par le mélange chloroforme - méthanol de polarité

croissante (par un enrichissement progressif en méthanol). Le débit est réglé à 2 à 3 ml par minute.

<u>Fractions</u>	<u>Eluants</u>	<u>Volume d'éluant</u>	<u>Constituants</u>
I	chloroforme	50 ml	lipides neutres
II	5 % méthanol dans chloroforme	50 ml	acides phosphatidiques
III	20 % " "	100 ml	céphalines
IV	40 % " "	50 ml	colaminocéphaline
V	60 % " "	100 ml	lécithines
VI	80 % " "	100 ml	lécithine + sphingomyéline
	+ 4 % d'eau		

Chaque fraction est évaporée sous vide à 35-40 °C, séchée et pesée. Chaque éluat sert au dosage du phosphore et azote (parfois) ainsi qu'à la chromatographie sur couche mince, destinée à leur identification).

2° Chromatographie sur couche mince

La chromatographie est effectuée sur des plaques de verre de 20 x 20 cm et 5 x 20 cm, recouvertes d'une couche de Kieselgel G Merck de 250 μ d'épaisseur, préparé en mélangeant 30 g de Kieselgel à 60 ml d'eau. Les plaques sont séchées à température ambiante.

Après une activation des plaques par la chaleur (30 minutes à 110° C), les prises d'essai de 80 à 100 μ g de lipides sont appliquées sur la plaque à l'aide d'une microsiringue de 5 μ l de volume. La cuve, tapissée de papier Joseph est saturée de vapeur du système solvant.

Nous utilisons le système chloroforme - méthanol - eau 65 / 25 / 4 V / V (47) avec une migration ascendante de 50 à 60 minutes, pour le fractionnement des lipides polaires (7).

Tous les lipides sont révélés par les vapeurs d'iode, certains sont caractérisés par la ninhydrine (céphaline et lysocéphaline), le réactif de Dragendorff modifié (lécithine, lysolécithine) (6) ou le réactif à l' α -naphтол (glycolipides) (14).

E. ANALYSE DES LIPIDES

1° Dosage du phosphore

Nous adoptons la technique classique du dosage du phosphore par colorimétrie selon MACHEBOEUF et DELSAL (32) basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone. Ce dosage ne concernant que les orthophosphates, le phosphore organique (20 à 30 %) sera d'abord minéralisé par attaque sulfo-nitro-perchlorique. (24)

2° Dosage de l'azote (35)

On réalise d'abord une minéralisation sulfurique en présence d'un catalyseur ($\text{SO}_4\text{K}_2 + \text{SO}_4\text{Cu}$) qui permet la transformation de l'azote organique en azote ammoniacal $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Cette attaque doit être poursuivie au moins durant 3 heures après la décoloration du mélange.

On procède ensuite à une distillation du contenu du matras de Kjeldhal dans l'appareil de PARNAS-WAGNER en présence de soude. Cette base forte déplace l'ammoniaque qui distille, entraînée par un courant de vapeur d'eau.

L'azote ammoniacal est dosé à la sortie de l'appareil par l'acide sulfurique titré, en présence d'indicateur mixte : rouge de méthyle - vert de bromocrésol dont le virage du rouge au vert a lieu à pH 5,1.

CHAPITRE II

ÉTUDE DU LAIT

A. LAIT EN POUDRE ENTIER (28 % M.G.) NON SUCRÉ, HOMOGENÉISÉ, MARQUE NIDO

Les expériences portent sur un échantillon de ce lait en boîte de 500 g destiné au commerce et utilisé tel quel.

La teneur en matière sèche est établie par dessiccation à l'étuve à 105 - 110° C, jusqu'à poids constant, d'une prise d'essai d'environ 1 g de poudre de lait.

1° Résultats expérimentaux d'extraction

Ils sont résumés dans le tableau II

● La quantité de prise d'essai

En maintenant stable tous les facteurs intervenant dans l'opération, nous faisons varier la quantité de prise d'essai de l'échantillon. Nous constatons que l'augmentation de celle-ci n'améliore pas le rendement du procédé, et bien au contraire, en entraîne une diminution. La quantité optimale se plaçant aux environs de 1 gramme, nous extrayons, par la méthode à froid, 287,9 mg de lipides purifiés par gramme de matière sèche; alors que pour

TABLEAU II

Lipides extraits en mg/g de matière sèche

MÉTHODES	FOLCH			KUMAGAWA CLASSIQUE			KUMAGAWA MODIFIÉE			AZÉO. SIMPLE			AZÉO. DOUBLE			MÉTHODE A FROID			
	lip.	lip.	surch.	lip.	lip.	surch.	lip.	lip.	surch.	lip.	lip.	surch.	lip.	lip.	surch.	lip.	lip.	surch.	%
FRACTIONS	bruts	purs	%	bruts	purs	%	bruts	purs	%	bruts	purs	%	bruts	purs	%	bruts	purs	%	
Série 1	280,0	273,2	2,49	283,5	280,2	1,18	289,5	278,2	4,02	275,4	274,4	0,36	282,1	280,0	0,75	293,4	287,3	2,12	
Série 2	279,9	277,6	0,83	283,7	282,4	0,46	287,9	279,0	2,47	283,1	275,4	3,17	288,9	285,2	1,29	288,4	287,5	0,31	
Série 3				283,8	282,7	0,39							289,2	286,4	0,98	289,6	288,9	0,24	
MOYENNES	279,9	275,4	1,66	283,7	281,7	0,67	288,7	278,6	3,24	279,2	274,5	1,76	286,7	283,8	1,00	290,4	287,9	0,89	

Remarques :

- M.S. % du produit traité = 97,41 %
- AZÉO. désigne la méthode d'extraction azéotropique
- AZÉO. DOUBLE est le double épuisement d'une même prise d'essai avec la réhydratation des résidus de la première, par 10 ml d'eau distillée pendant 30 minutes.
- La surcharge est la différence entre lipides bruts et purifiés

une prise d'essai de 4 g du lait en poudre, nous n'extrayons que 277,7 mg de lipides purs par gramme de matière sèche.

● Réhydratation du matériel

Une réhydratation préalable du matériel étant nécessaire, le matériel sec traité nous a fourni des résultats aberrants.

Nous avons essayé de trouver la quantité d'eau ainsi que la durée de réhydratation optimales.

Les meilleurs résultats sont obtenus en réhydratant 1 gramme de matériel par 10 ml d'eau pendant 30 minutes (dans ce cas, le matériel réhydraté prend l'aspect du lait naturel).

Or, nous avons constaté que la diminution de quantité d'eau jusqu'à 5 ml/g, et une durée de réhydratation inférieure à 30 minutes abaissaient la valeur de l'extraction. Ainsi pour une réhydratation de 5 ml d'eau/g du matériel traité nous extrayons pour une durée de réhydratation de :

30 minutes	285,4	mg	lip. purs	/ g	M.S.
1 minute	279,6	"	"	"	"

La durée de l'extraction étant de 30 minutes, l'augmentation des deux facteurs (temps et quantité d'eau de réhydratation au-delà des valeurs décrites) n'entraîne aucune amélioration sensible de rendement.

● Durée d'extraction

L'influence de ce facteur sur le rendement de l'extraction dépend du procédé employé : ainsi pour le Kumagawa modifié, un épuisement continu de 4 heures ne fournit que 265,3 mg de lipides purs par gramme de matière sèche, alors qu'un autre prolongé jusqu'à 8 heures en fournit 279 mg.

La différence existant entre les deux procédés azéotropiques, simple et à double extraction, peut dans certains cas s'expliquer par la différence

entre les temps d'extraction en chiffres moyens :

274,9 mg / g M.S. pour le premier
et 283,8 mg / g M.S. pour le deuxième.

Dans la méthode à froid, nous faisons les constatations suivantes :

<u>Durée d'extraction</u>	<u>Lipides purs extraits</u>
5 minutes	277,1 mg / g M.S.
30 "	285,4 "
60 "	287,5 "
120 "	288,9 "

A partir de ces limites, la prolongation de la durée d'extraction n'entraîne aucune amélioration du rendement, et parfois même peut être la cause de dégradation de quelques fractions des lipides ainsi que nous le verrons plus loin.

● Surcharge non lipidique

Le pourcentage de cette surcharge a été rapporté au poids de l'extrait purifié suivant la méthode de Folch (15). Les substances non lipidiques entraînées dans l'extrait sont d'importance extrêmement variable, et ceci serait dû, peut-être, à l'élimination incomplète de l'eau dans le procédé azéotrope, ou bien à l'évaporation incomplète sous vide, ce qui laissera une trace d'alcool qui solubiliserait certains produits non lipidiques et les entraînerait dans le chloroforme contenant les lipides bruts.

2° Conclusions

La différence d'efficacité des diverses méthodes apparaît très nettement ici. Si nous nous rapportons à la moyenne des chiffres fournis par la méthode à froid, les différentes autres techniques se classent ainsi suivant les chiffres

moyens qu'elles fournissent :

- méthode à froid	:	100
- azéo. simple	:	95,32
- méthode de Folch	:	96,08
- méthode de Kumagawa modifiée	:	96,57
- méthode de Kumagawa classique	:	97,85
- méthode azéo. double	:	99,13

La méthode à froid est remarquablement bien adaptée à ce matériel : elle est rapide, donne de bons résultats, et les surcharges non lipidiques entraînées sont en général un peu moindres que dans les autres méthodes d'extraction.

B. LAIT EN POUDRE PARTIELLEMENT ÉCRÉMÉ (12 % M.G.), SUCRÉ, HOMOGENÉISÉ, MARQUE NIDO

En nous rapportant aux résultats obtenus sur l'échantillon précédent, nous allons comparer seulement l'efficacité de deux méthodes d'extraction : à froid et azéotropique double, tout en examinant les différents facteurs intervenant dans l'opération.

● La quantité de prise d'essai

Nous prélèverons successivement 1, 2 et 5 grammes de matériel. La réhydratation est faite par 10 ml d'eau distillée par gramme, 30 minutes avant l'extraction, elle-même dure 30 minutes pour la méthode à froid, et deux fois 1 heure pour la double extraction azéotropique.

Les résultats obtenus sont exposés sur le tableau **III**.

TABLEAU III

Lipides extraits en mg/g matière sèche

Prise d'essai	1 g	2 g	5 g
Méthode à froid	119,1	118,9	115,5
Méthode azéotrope	116,2	115,9	113,2

M.S. % du produit traité est 98,20 %

Nous aboutissons une fois de plus à cette conclusion que le rendement d'extraction décroît lorsque la prise d'essai augmente.

Il semble qu'il y ait un phénomène de partage des lipides entre la phase solide et la phase liquide (3); on doit donc obtenir un meilleur rendement, pour une quantité élevée de prise d'essai, en renouvelant le mélange solvant (41).

● Réhydratation du matériel

Comme dans le cas de l'échantillon précédent, le temps minimum nécessaire pour l'hydratation est de 30 minutes. Au-dessous de cette limite, le rendement de l'extraction s'abaisse. Ainsi, pour 1 gramme de lait en poudre écrémé (12 % M.G.) nous obtenons :

pour 30 mn de réhydratation : 119,1 mg/g M.S.

pour 15 mn de réhydratation : 115,9 mg/g M.S.

Au-dessus de 30 minutes, nous ne constatons pas de variation sensible de rendement.

● Discussion

Au cours de ces essais, nous constatons une légère supériorité de la méthode à froid par rapport à la méthode azéotrope double. Toutefois,

cette supériorité est loin d'être décisive. Aussi nous proposons-nous de vérifier l'efficacité des deux méthodes à l'égard d'un échantillon encore plus pauvre en matière grasse.

C. LAIT EN POUDRE ÉCRÉMÉ (0,7 % M.G.), SUCRÉ, MARQUE GUIGOZ

Etant donnée la faible teneur de cet échantillon en matière grasse, nous avons été obligé de faire des prélèvements plus importants que dans le cas des deux échantillons précédents, pour que la quantité des lipides extraits soit notable.

La teneur en matière sèche a été établie, comme dans les cas précédents, par dessiccation à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

TABLEAU **IV**

Lipides extraits en g/g de matière sèche du lait en poudre écrémé

KUMAGAWA MODIFIÉE			EXTRACTION AZÉO. DOUBLE			MÉTHODE A FROID		
Prise d'essai	% M.S.	Lipides purs	Prise d'essai	% M.S.	Lipides purs	Prise d'essai	% M.S.	Lipides purs
5 g	98,60	0,63	10 g	98,66	0,86	5 g	98,33	0,98
5 g	98,60	0,88	10 g	98,40	0,74	5 g	98,33	0,96
5 g	98,43	0,60	5 g	98,60	1,04	5 g	98,40	1,14
5 g	98,43	0,65	5 g	98,43	0,96	5 g	98,40	1,09
						5 g	98,22	1,06
						5 g	98,22	1,08
Moyennes			10 g	98,54	0,80			
5 g	98,51	0,69	5 g	98,52	1,00	5 g	98,32	1,05

Discussion

D'après le tableau **IV**, l'inefficacité de la méthode de Kumagawa modifiée à l'égard de cet échantillon est démontrée. Toutefois, nous constatons deux autres faits : d'une part, une certaine égalité de rendement entre les méthodes à froid et azéotropique double, surtout dans le cas des prises d'essai de 5 g et, ce qui va finalement déterminer le choix de l'une d'elles, sera la comparaison de leurs rendements qualitatifs respectifs; d'autre part, dans la méthode de double extraction azéotropique, une baisse de rendement de 20 % pour un doublement de la prise d'essai (de 5 g à 10 g).

Nous avons tenu à vérifier ce phénomène dans le cas de la méthode à froid. Les résultats obtenus sont les suivants :

<u>Prise d'essai</u>	<u>Lipides purs/ M.S.</u>
1 g	1,26 %
2 g	1,11 %
3 g	1,04 %
4 g	1,00 %
10 g	0,83 %

(% M.S. = 98,66 %)

Donc, malgré la faible teneur du matériel en M.G., le phénomène de partage des lipides entre la phase solide et la phase liquide influence toujours le rendement de l'extraction.

D. CAS PARTICULIER DU LAIT CONCENTRÉ SUCRÉ NESTLÉ (9,5 % M.G.)

Du fait de sa nature particulière, ce matériel présente quelques difficultés lors de l'analyse, à l'égard desquelles la plupart des méthodes d'extraction

sont en défaut. Nous avons donc tenu à comparer l'efficacité de différents procédés et les résultats sont représentés dans le tableau V.

La boîte contenant l'échantillon a été chauffée dans un bain-marie de 30 à 35° C, ensuite on transfère le contenu dans un bécher et on brasse avec une spatule jusqu'à parfaite homogénéisation. Pour le dosage de M.G. on prélève environ 3 à 4 g de substance; tous les prélèvements sont faits simultanément. Les prises d'essais sont diluées par 10 ml d'eau distillée. Le taux moyen de matière sèche est 73,79 %.

TABLEAU V

Lipides purs extraits en mg/g de M.S.

KUMAGAWA MODIFIÉE		DOUBLE EXTRACTION AZÉO.		MÉTHODE A FROID	
Prise d'essai en g	Lipides purs	Prise d'essai en g	Lipides purs	Prise d'essai en g	Lipides purs
4,0092	12,81	4,0672	13,01	4,0715	13,45
4,1041	12,24	4,1126	13,68	4,1962	13,65
4,0613	12,49			4,0760	13,24
	12,51		13,34		13,34

La méthode de Kumagawa, comme dans le cas du lait en poudre, se révèle ici peu efficace par rapport aux deux autres; celles-ci, par ailleurs, ayant même valeur.

CHAPITRE III

ÉTUDE DU LAIT STÉRILISÉ

Notre étude systématique proprement dite, a porté sur le lait stérilisé homogénéisé de commerce. Le choix de cet échantillon avait plusieurs raisons :

Le département de l'Hérault n'ayant pas un élevage de vaches laitières, il ne nous a pas été facile de nous procurer des échantillons de lait frais. D'autre part, la manipulation est plus facile pour le lait homogénéisé que pour le lait non homogénéisé, car ce dernier nécessite une homogénéisation mécanique par agitation pour que soient faits des prélèvements convenables.

Il apparaît que certaines des méthodes classiques d'extraction se trouvent en défaut, lorsqu'il s'agit d'analyser des laits homogénéisés, par exemple la méthode par extraction éthero-acétique (dite du Laboratoire Municipal de Paris) (2). Nous sommes donc obligé de reprendre comme méthode de référence celle de Röse - Gottlieb (45 et 46) qui ne convient en principe que pour l'examen des laits frais, mais qui donne aussi des résultats corrects lors de l'analyse du lait homogénéisé stérilisé conservé dans son récipient d'origine.

Par ailleurs, cette même méthode donne très fréquemment des résultats aberrant, lorsque les échantillons ont été transvasés pour les rendre anonymes

et formolés, pour assurer leur conservation. Il est donc clair que l'application des différentes méthodes à du matériel ainsi traité, et la comparaison des résultats obtenus peut donner un renseignement particulièrement précis sur l'efficacité de ces méthodes.

Le lait de vache étant très pauvre en phospholipides, le contrôle de la quantité de phosphore lipidique peut être utilisé comme un indice d'appréciation d'efficacité. Nous ne développerons pas ici la question des phospholipides, il en sera suffisamment parlé dans les prochains chapitres. Nous nous contentons d'un simple dosage de phosphore lipidique par la méthode colorimétrique de MACHEBOEUF et DELSAL (32).

Il y a, dans le cas du lait homogénéisé stérilisé, un autre point à remarquer : ce lait est fourni dans des bouteilles de 1/2 et 1 litre; or, on est amené à renouveler les bouteilles pour chaque série d'analyses, ce qui fait varier d'une analyse à l'autre, le taux d'extrait sec et par conséquent le taux de matière grasse.

Nous sommes donc obligé d'exprimer les lipides extraits, non pas en grammes par litre de lait mais en grammes pour 100 de matière sèche, car le lait étant considéré de grand mélange, le rapport entre la matière sèche totale et la matière grasse est presque toujours stable.

1° Résultats

Pour ne pas surcharger de chiffres notre texte, les résultats des essais préliminaires ne seront pas mentionnés ici. Nous donnerons en revanche ceux des essais comparatifs, effectués avec les trois méthodes (Röse-Gottlieb, azéotropique à chaud et méthode à froid) sur divers échantillons de lait stérilisé homogénéisé du commerce, puis sur ces mêmes échantillons conservés pendant quelques jours, à la température du laboratoire, par le formaldéhyde

(1 ml de formol à 40 % par litre de lait). Ces derniers échantillons ont été, avant l'analyse, soumis à l'homogénéisation mécanique. (Tableau **VI**)

TABLEAU **VI**

Efficacité des différentes méthodes pour l'extraction des lipides du lait stérilisé homogénéisé

MODES OPÉRATOIRES	NON FORMOLÉ			FORMOLÉ	
	% M. G. /M. S.	% surcharge	% P lipidique	% M. G. /M. S.	% surcharge
Extraction éthero-ammoniacale : Röse - Gottlieb	26,47	0,37	0,012	22,44	2,82
	25,76	2,76	0,012	22,36	3,51
	26,85	3,95	0,013	21,80	3,94
	26,98	1,84	0,013	22,15	3,35
	26,91	1,51	0,012		
	27,07	3,03	0,013		
	25,48	4,79	0,012		
	26,15	1,00	0,012		
moyenne :	26,46	2,39	0,012	22,19	3,40
Azéotropique à chaud : moyenne : benzène - éthanol	simple { 26,53 26,60 -----	0,42	0,027	27,47	1,31
		1,26	0,027	25,20	1,80
	moyenne :	0,84	0,027	26,33	1,55
	double { 27,77 27,42 27,70 -----	1,75	0,027		
		2,82	0,027		
		1,91	0,026		
	moyenne :	2,16	0,027		
Extraction à froid : benzène - éthanol	27,86	3,09	0,019	28,25	1,55
	27,61	2,60	0,019	27,51	1,97
	27,49	2,30	0,022		
	27,89	2,61	0,026		
	27,88	2,67	0,023		
	27,77	0,33	0,023		
	27,67	1,79	-		
	27,53	0,64	0,023		
	27,79	1,64	-		
	28,01	0,44	0,022		
	28,05	0,50	0,023		
	28,27	0,40	0,022		
	-----	-----	-----	-----	-----
moyenne :	27,82	1,58	0,022	27,88	1,76

2° Discussion

D'après le tableau **VI**, les deux dernières méthodes se montrent plus efficaces que la méthode de Röse - Gottlieb.

● Lait non formolé

La quantité de phosphore lipidique est double avec les azéotropes chauds et froids, et il y a un moindre taux de surcharges non lipidiques chez ces derniers, et surtout dans la méthode à froid.

Pour l'azéotrope à chaud, une double extraction se révèle bien plus efficace qu'une simple, malgré un taux élevé de surcharges non lipidiques. Pourtant les phosphores lipidiques dans les deux procédés restent sensiblement voisins.

En ce qui concerne la méthode à froid, elle paraît plus efficace (27,82 % M.G. et 1,58 % surcharges) que la méthode azéotropique à chaud (27,63 % M.G. et 2,16 % surcharges). Toutefois, la méthode azéotropique extrait 0,027 % de phosphore lipidique contre 0,023 % pour la méthode à froid, mais ces écarts ne sont pas très significatifs. Nous pouvons considérer ces deux méthodes comme équivalentes, et le choix de l'une ou de l'autre dépendra seulement de la facilité des manipulations.

Il faut tout de même remarquer qu'avec la méthode à froid le risque de dégradation des phospholipides est écarté alors qu'avec la méthode azéotropique à chaud l'épuisement d'une heure au benzène - alcool bouillant risque de dégrader ces constituants.

● Lait formolé

Comme nous pouvions nous y attendre, la méthode de Röse - Gottlieb tombe en défaut avec ces échantillons : lait non formolé, 26,46 % M.G. et 2,39 % surcharges, et lait additionné de formol, 22,19 % M.G. et 3,40 % surcharges.

La méthode azéotropique manifeste la même efficacité à l'égard des deux échantillons, toutefois avec un taux de surcharges double dans le cas de lait formolé : 26,56 % M.G. et 0,84 % surcharges pour le lait non formolé et 26,33 % M.G. et 1,55 % surcharges pour le lait formolé.

L'addition de formol dans le lait n'a pas d'influence sur l'efficacité de la méthode à froid : 27,82 % M.G. et 1,58 % surcharges pour le lait non formolé et 27,88 % M.G. avec 1,76 % surcharges pour le lait additionné de formol.

● ROLE DE L'AMMONIAQUE

Le faible rendement des lipides extraits par la méthode de Röse-Gottlieb nous a conduit à étudier l'influence des divers réactifs employés dans cette méthode. Parmi ceux-ci, l'ammoniaque paraît être un obstacle pour une bonne extraction. Nous avons additionné d'ammoniaque les échantillons dans lesquels nous avons dosé les lipides par la méthode à froid.

Aux prises d'essai de 10 ml de lait stérilisé homogénéisé, nous ajoutons 2 ml d'ammoniaque R.P., ensuite nous extrayons les lipides par le procédé décrit. Dans les mêmes conditions, nous effectuons des dosages à blanc sans addition d'ammoniaque. Les chiffres moyens obtenus sont : 27,60 % M.G. avec 0,023 % P lipidique pour l'essai à blanc et 26,96 % M.G. avec 0,020 % P lipidique pour l'essai avec l'ammoniaque.

Cette baisse de rendement est d'autant plus forte qu'il y a davantage d'ammoniaque : en ajoutant 1, 2 et 4 ml d'ammoniaque pour 10 ml de lait, l'on extrait 27,22 %, 26,96 % et 25,09 % M.G./M.S.

Nous supposons qu'il s'agit d'un commencement de saponification, rendant inextractible les sels ammoniacaux des acides gras.

● ROLE DU VOLUME DE MÉLANGE DE SOLVANTS

Bien que l'extraction des lipides de 10 ml de lait stérilisé homogénéisé par 250 ml du mélange benzène - alcool puisse être considérée comme satisfaisante dans le souci de trouver les meilleures conditions de manipulation, nous nous sommes efforcé de rechercher le volume optimal du mélange solvant nécessaire pour une bonne extraction par la méthode à froid.

Nous avons épuisé 10 ml de ce lait, respectivement par 250 ml, 125 ml et 62,5 ml de mélange benzène - éthanol en proportion 4 / 1.

Nous obtenons :

26,93 % de M.G. avec 250 ml de mélange solvant

24,33 % de M.G. avec 125 ml de mélange solvant

22,61 % de M.G. avec 62,5 ml de mélange solvant.

Un volume de solvant supérieur à 250 ml n'apporte pas une amélioration sensible du rendement.

La méthode est toujours valable pour l'extraction de grandes quantités du matériel à condition que le rapport entre la prise d'essai et le volume de mélange solvant reste toujours 10 ml / 250 ml. Par exemple, sur une prise d'essai de 50 ml de lait, avec 1250 ml de solvant (41) nous arrivons même à extraire 28,26 % de lipides purs. Une deuxième extraction à froid avec 250 ml de mélange solvant, sur les résidus provenant de cet essai, ne nous fournit que 1,2 mg de lipides bruts, ce qui ne peut pas être purifié quantitativement. Un épuisement d'une heure des résidus de cette dernière par la méthode azéotropique à chaud n'extraît que 0,4 mg de lipides bruts. La chromatographie sur couche mince d'acide silicique montre que ces lipides ne sont pas différents de ceux extraits en premier lieu, autrement dit, ne sont pas plus riches en phospholipides que les autres extraits lipidiques.

Remarque - Dans le cas de la méthode azéotropique à double extraction, après le premier épuisement, nous réhydratons les résidus et nous les épuisons une fois de plus. Généralement, avec ce deuxième épuisement, nous obtenons entre 1 à 5 mg de lipides bruts. Ces lipides sont additionnés aux lipides de première extraction, après quoi ils sont purifiés par la méthode de Folch.

Avec la méthode à froid, une deuxième extraction sur le résidu donne des lipides bruts dont le poids ne dépasse pas 2 mg.

● EMPLOI DU MÉTHYLAL POUR LE DOSAGE DE LA MATIÈRE GRASSE DU LAIT

A la recherche d'un procédé convenable pour le dosage des lipides du lait, NAVELLIER P. et BRUNIN R. (37) se sont heurtés aux mêmes problèmes que nous dans le cas du lait stérilisé homogénéisé formolé ou non, et ont proposé l'emploi du méthylal.

Le méthylal, encore nommé éther - diméthyl aldéhyde, diméthylate de méthylène, ou formal est un acétal de formule $\text{CH}_2 (\text{O CH}_3)_2$, bouillant à 42°C , miscible à quatre parties d'eau.

Le méthylal est à la fois un solvant des matières grasses et un agent de coagulation des protéines. En rompant les cénapses lipido-protidiques, il favorise l'extraction de la matière grasse du lait, et peut être utilisé en vue du dosage de celle-ci. L'action du méthylal n'est pas perturbée par la présence de formaldéhyde utilisé comme conservateur.

Le coagulum protéique obtenu présente parfois une consistance visqueuse qui gêne son épuisement par le solvant. DELSAL (11) avait observé que l'addition du méthanol changeait la consistance de ce coagulum qui est alors

poreux et friable, et son épuisement est facilité. Le méthylal forme avec le méthanol un azéotrope contenant pour 100 g : méthylal 92,15 g et méthanol 7,85 g.

Dans le cas général, nous utilisons 4 volumes de méthylal et 1 volume de méthanol.

L'appareil dont se sont servi les auteurs de ce procédé est un extracteur B.B.S., type macro, muni d'un perforateur pour solvants légers, et appareil chauffant approprié.

Nous utilisons ce mélange solvant dans les méthodes d'extractions azéotropique à chaud et la méthode à froid, et nous comparerons les résultats obtenus avec ceux acquis en utilisant le mélange azéotropique benzène - alcool.

TABLEAU **VII**

Lipides extraits en g par litre de lait

Procédé utilisé \ Mélange solvant	MÉTHYLAL - MÉTHANOL		BENZÈNE - ETHANOL	
	formolé	non formolé	formolé	non formolé
Azéotropique à chaud	30,62	30,85	32,80	33,64
Azéotropique à froid	31,35	33,77	33,53	34,20
NAVELLIER & BRUNIN	29,80	30,10	—	—

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau **VII**. Le mélange solvant méthylal - méthanol n'apporte aucune amélioration quant aux chiffres déjà obtenus par application du mélange solvant benzène - éthanol.

Le procédé proposé par NAVELLIER et BRUNIN est long et fastidieux; il dure 8 heures et a besoin d'extractions supplémentaires. Par exemple, dans le cas du lait non formolé, les 30,10 g de lipides au litre sont obtenus

par trois extractions successives, tandis que les 34,20 g de lipides au litre, dans le cas de ce même lait mais avec la méthode à froid, et mélange solvant benzène - éthanol provient d'une seule et unique extraction d'une 1/2 heure.

3° Conclusions

1. - L'extraction des lipides du lait stérilisé homogénéisé par le mélange azéotropique benzène - alcool (4/1) est total et satisfaisant. Les deux méthodes azéotropiques à chaud et à froid ont presque la même efficacité, seulement la méthode à froid est avantageuse parce qu'elle ne dure qu'une 1/2 heure, et il n'y a pas de risque de dégradation des phospholipides par la chaleur; toutefois, la filtration nécessaire pour séparer les deux phases, solide et liquide, est assez longue.

2. - La purification de FOLCH étant nécessaire et même obligatoire, une double purification paraît préférable.

Le taux des surcharges non lipidiques varie dans des conditions indéfinies. Elles sont constituées par du lactose, des protéines, des sels, etc...

Certaines fractions des lipides, lors de leur purification, passent dans la phase $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ supérieure; cette phase est évaporée et les lipides éventuellement présents sont repris par le chloroforme. La quantité de ces lipides est variable mais ne dépasse jamais 2 mg, et bien souvent se situe au-dessous de 1 mg.

3. - Les facteurs essentiels intervenant sur le rendement sont systématiquement étudiés et les meilleures conditions établies.

L'addition de formol pour la conservation des laits n'a pas d'influence sur l'efficacité des procédés proposés.

Nous prendrons donc la méthode à froid ou la méthode azéotropique comme méthodes de base, pour notre étude qualitative.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DU FROMAGE DE ROQUEFORT

En raison du taux élevé d'acidité du fromage de Roquefort, la plupart des méthodes classiques d'extraction des lipides, et en particulier, la méthode de Röse - Gottlieb, sont en défaut.

La Fédération Internationale des Laiteries a proposé une méthode particulière pour l'épuisement des fromages qui est désignée sous le nom de "Norme Internationale F.I.L. n° 5" (29). Elle consiste en une digestion d'environ 3 g de l'échantillon broyé et homogénéisé du fromage par 10 ml d'acide chlorhydrique concentré, dans un tube ou ballon, que l'on place dans un bain-marie bouillant, en agitant de temps en temps jusqu'à complète dissolution du fromage. On refroidit le ballon. On ajoute 10 ml d'alcool éthylique. On mélange bien, puis on ajoute successivement : 25 ml d'éther éthylique et 25 ml d'éther de pétrole, en agitant à chaque fois pendant une minute.

On laisse décanter la couche éther - éther de pétrole (2 heures environ), on sépare les deux couches éthérée et aqueuse par un dispositif de siphonnage. On répète l'extraction une deuxième et même une troisième fois avec les mêmes volumes de solvants. Les couches éthérées réunies sont évaporées et forment les lipides bruts. Ces lipides sont purifiés comme d'habitude par la méthode de purification de FOLCH.

Le but de cette étude est de comparer la méthode F.I.L. n° 5 avec la méthode azéotropique à chaud et la méthode à froid, et par là de choisir une méthode pour nos études qualitatives sur le fromage, le caillé et d'autres dérivés du lait. Il est bien entendu que la méthode la plus efficace, outre son rendement supérieur, doit extraire davantage de phosphore lipidique, et c'est surtout sur ce critère que nous choisirons la meilleure méthode.

La matière sèche des fromages est calculée d'après les processus décrits par la "Norme Internationale F.I.L. n° 4 (29). Le chiffre moyen se situe aux alentours de 58 % M.S.

Les prises d'essai d'environ 3 g de fromage sont délayées dans 5 ml d'eau distillée pour favoriser le contact solvant - fromage par sa dispersion dans le milieu d'extraction.

Les résultats des extractions figurent dans le tableau **VIII**

TABLEAU **VIII** (*)

PROCÉDÉS	% M.G. / M.S.	% surcharges	% P lipidique (moyenne)
F.I.L. n° 5	55,76	0,61	0,001 %
	55,62	0,37	
Moyenne	55,69	0,49	
Azéotropique à chaud double extractions	52,02	9,02 ?	0,0186 %
Méthode à froid	54,02	1,04	0,0180 %
	54,59	1,24	
Moyenne	54,31	1,14	

(*) % M.S. = 58,37 %

1° Exploitation des résultats

Pour une étude quantitative, la méthode F.I.L. n° 5 est une méthode idéale car elle extrait le maximum de lipides de l'échantillon : 55,69 %. Mais pour l'étude des phospholipides, il faut qu'un bon procédé arrive à extraire la totalité de ces fractions des lipides, et ceux-ci dans un état non dégradé. Or, avec cette méthode, le taux 0,001 % de phosphore lipidique extrait est infime, par rapport à ce qui est présent dans la prise d'essai. Le sort des phospholipides et la raison de leur absence dans les extraits lipidiques nous sont inconnus.

L'action de digestion de fromage dans l'acide chlorhydrique est peut-être à l'origine de ce défaut de la méthode.

Avec la méthode azéotropique, le cas est inverse; le rendement le plus élevé des phospholipides (0,0186 % P. lipidique) pour le rendement le plus bas des lipides purs totaux (52,02 % M.G. / M.S.); toutefois, avec un taux des surcharges non lipidiques inattendu et paradoxal de 9,02 %. Ceci est dû, supposons-nous, à la présence des sels divers au sein de fromage, qui, à la suite d'épuisement à l'ébullition, manifestent une solubilité élevée et qui, par la purification de FOLCH, sont éliminés.

Avec la méthode à froid, les écarts sont moindres, un rendement des lipides purs totaux, 54,31 %, qui se rapproche de celui de F.I.L. n° 5, et un rendement des phospholipides (0,0180 % P. lipidique) se rapprochant de celui de la méthode azéotropique à chaud.

Sur un autre échantillon de ce fromage, ayant 57,74 % de matière sèche totale, nous avons étudié l'action du mélange solvant métylal - méthanol d'une part, et d'autre part, l'effet de l'ammoniaque.

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau suivant (tableau **IX**).

TABLEAU IX

Méthode à froid

PROCÉDÉS	% M. G. /M. S.	% surcharges	
BENZÈNE-ÉTHANOL	sans NH ₄ OH	53,34 2,08	
		52,87 2,55	
	moyenne	53,10 2,32	
	avec NH ₄ OH { 2 ml 10 ml	51,37 1,26	
			47,81 0,92
MÉTHYLAL-MÉTHANOL		48,56 6,45	
		47,64 2,50	
	moyenne	48,10 4,47	

Il résulte de ce tableau que, comme dans le cas du lait, l'ammoniaque abaisse le taux de lipides extraits, et d'autant plus qu'on en ajoute davantage. Les acides gras libres provenant des actions lipolytiques forment, supposons-nous, des sels ammoniacaux qui ne sont plus extractibles par les solvants. Ceci nous conduit d'une part, à comprendre pourquoi la méthode de Röse - Gottlieb est inefficace, et d'autre part, à affirmer le rôle favorisant de ClH dans la méthode de F.I.L. n° 5.

D'autre part, dans le cas du fromage le mélange solvant méthylal - méthanol utilisé à froid est loin d'être aussi efficace que le mélange benzène - alcool.

Conclusions

Comme dans le cas du lait stérilisé, l'emploi du mélange solvant benzène - éthanol à froid ou avec entraînement azéotropique à chaud, est efficace pour extraire la quasi-totalité des lipides du matériel; le taux du phosphore lipidique dans l'extrait est le plus élevé avec ces méthodes, ce qui les rend parfaitement convenables pour nos études qualitatives.

DEUXIÈME PARTIE

**ÉVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES
A PARTIR DU LAIT DANS LES FROMAGES**

CAS DU FROMAGE DE ROQUEFORT

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS ET DÉFINITIONS

Il y a juste un siècle que pour la première fois, en 1867, TOMATSCHEF (56) a observé qu'il y a des phosphatides dans le lait. Etant donné que les phospholipides, faisant partie des lipides de "constitution", se trouvent dans tous les tissus animaux et végétaux, il ne sera pas surprenant d'en trouver de petites quantités dans le lait.

Ils présentent les caractères lipidiques (caractères chimiques : fonctions esters, présence d'acides gras; caractères physiques : solubilité dans la plupart des solvants organiques, insolubilité dans l'eau), pourtant les phospholipides sont intensément hydrophiles, et surtout ils ont la propriété d'être fixés aux protéines sous forme d'associations complexes particulières. Ces "cénapses lipoprotidiques" (31) sont assez stables pour masquer les lipides à leurs réactifs habituels et ils sont responsables de la dispersion des lipides dans la phase aqueuse du lait et de leur maintien dans un état d'émulsion stable; les phospholipides sont les constituants les plus importants du film absorbé à la surface des globules gras. La question de la structure physique des globules gras a été traitée dans une monographie de KING (27) (23) qui propose le schéma ci-après, pour la membrane d'enveloppe d'un globule gras. (Fig. 2)

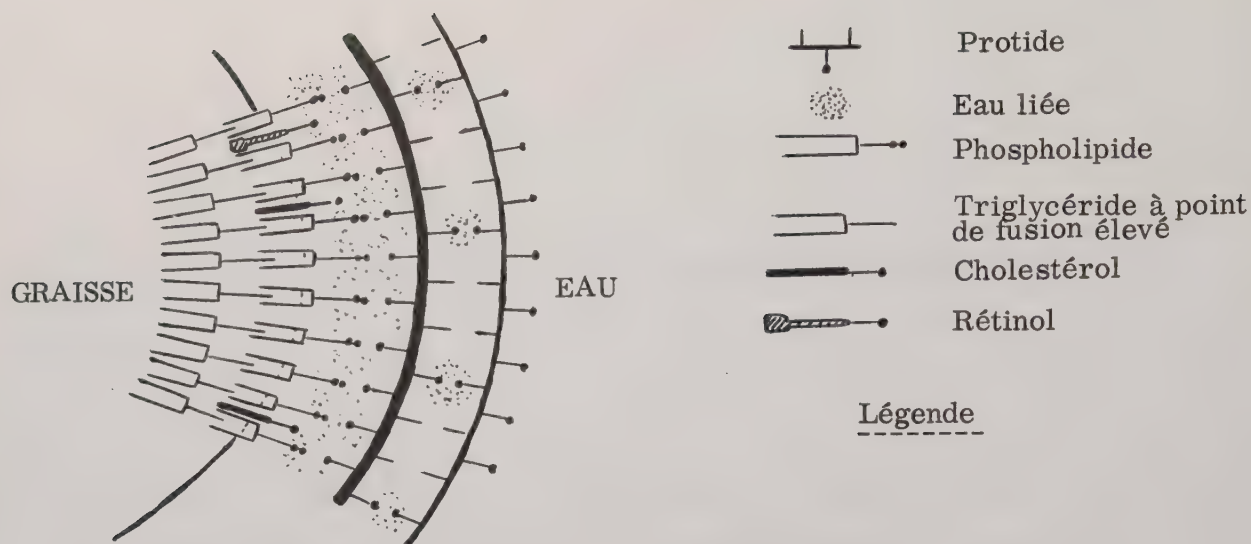
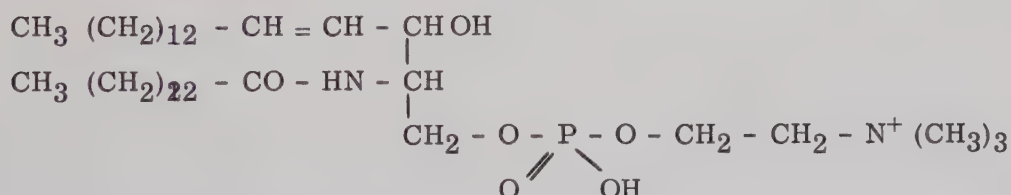
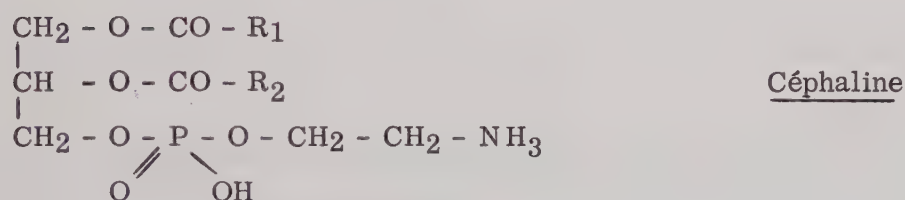
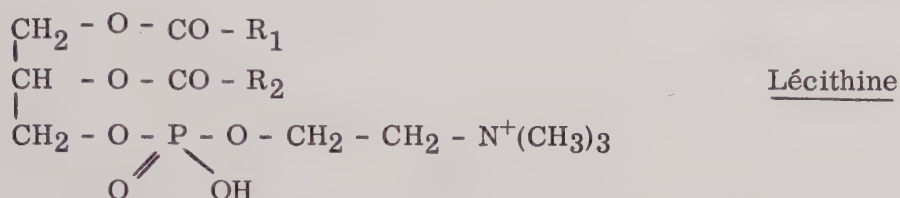


Fig. 2 - Structure de la membrane d'enveloppe d'un globule gras
d'après KING (22 - 23 - 27)

Le problème de l'apparition des phospholipides dans le lait et le processus suivant lequel ils sont synthétisés dans la glande mammaire sont aussi mal connus que leur rôle exact.

Pourtant un point intéressant est à remarquer : le glycérol, dans la synthèse des triglycérides, est dérivé primitivement du glucose. Le processus compliqué est évidemment le fractionnement classique du glucose en trioses et le précurseur immédiat est, semble-t-il l' α -glycérophosphate. Ce dernier produit pourrait être le matériau nécessaire et pour la synthèse des phospholipides et pour celle des triglycérides. Aussi est-il possible que le sang apporte normalement en quantités suffisantes ces substances nécessaires pour la sécrétion du lait.

Les phospholipides contiennent un composé azoté à fonction ammonium quaternaire (choline), amine primaire (colamine) ou acide aminé (sérine ou autres). Cette base organique est liée à l'acide phosphorique, qui lui-même estérifie une des fonctions du glycérol. Les phospho-aminolipides se ramènent aux trois types suivants où R_1 et R_2 désignent des acides gras saturés ou non, mais toujours en C_{12} ou plus.



Sphingomyéline (25)

Dans le lait, on trouve ces trois substances dans le rapport moyen :
lécithines = 30; céphalines = 45 et sphingomyéline = 25.

Les plus récentes découvertes sur ce sujet sont celles de RHODES et LEA (43). Ils ont analysé les phospholipides du lait écrémé, du babeurre et du beurre provenant d'un lot déterminé de lait, à l'aide des méthodes chroma-

tographiques, et ils ne trouvent pas de différences majeures entre les trois produits. La composition en % molaire des phospholipides du babeurre est : phosphatidyléthanolamine (céphaline) 29, phosphatidylsérine 10, phosphatidylcholine (lécithine) 33, sphingomyéline 19. Les inositol-phosphatides et les plasmalogènes ont été trouvés à des taux respectifs : 5 et 3 moles %. Les lysoglycérophospholipides et les cérébrosides n'ont pas pu être mis en évidence.

Les phospholipides sont des corps très fragiles, ils sont la cause de la décomposition amenant la "saveur de poisson" dans le beurre.

Il faut noter que dans la plupart des produits laitiers comme les fromages, yaourts, etc... la baisse de quantité de phosphore **lipidique** indique une décomposition des phospholipides, et c'est là une raison de plus pour montrer la participation éventuelle de ces corps dans les caractères organoleptiques des produits laitiers.

L'isolement des phospholipides totaux du lait et leur identification individuelle posent certains problèmes dus à la faible teneur du lait en ces constituants. Plusieurs chercheurs se sont préoccupés de mettre au point un procédé de séparation et de dosage des différentes fractions des phospholipides du lait et de ses produits (4, 16, 19, 25, 34, 48, 49, 50 et 51). Tous ces procédés sont basés sur l'exploitation des caractères physiques, parmi lesquels la différence de solubilité des fractions des phospholipides dans l'un ou l'autre solvant organique.

Dans la plupart des études citées, les lipides neutres sont préalablement éliminés. Dans ce but, les chercheurs ont choisi comme matière première la poudre de lait écrémé ou la poudre lyophilisée de babeurre. Les lipides totaux sont extraits par l'emploi de solvants variant suivant les chercheurs. Sur ces extraits purifiés, les lipides neutres et polaires sont séparés, soit

par précipitations répétées des phospholipides à l'acétone avec reprise du précipité dans le chloroforme (4, 23 et 42), soit par passage des lipides totaux sur colonne d'acide silicique (4, 16 et 51).

Ce dernier procédé permet la séparation complète des deux classes de lipides, mais elle ne permet pas d'opérer sur de très grandes quantités de lipides, si bien que dans certains travaux on fait d'abord un fractionnement des phospholipides à l'acétone avant de les séparer entre eux par chromatographie sur colonne d'acide silicique (33, 43 et 48).

CHAPITRE II

LE FROMAGE DE ROQUEFORT ET SA FABRICATION

Ce fromage a fait l'objet de notre étude quantitative, et nous avons vu qu'il contient en moyenne 58 % de matière sèche totale et entre 52 et 55 g de lipides purs pour 100 g de matière sèche. Le phosphore lipidique étant de 0,018 %, il correspond à 0,45 g de lécithine pour 100 g de lipides purs.

Ces phospholipides proviennent des différents constituants du fromage et évoluent sous l'influence de plusieurs facteurs dès le début de la fabrication, en cours d'affinage et jusqu'au moment de la consommation.

Il est donc nécessaire, pour pouvoir étudier cette évolution, de tenir compte des constituants du fromage, de leur nature et de leur composition, de leur destinée en cours de l'affinage, de leurs effets les uns sur les autres, etc...

Pour cela, nous croyons bon d'abord de passer en revue la fabrication du fromage de Roquefort et l'apport de ses constituants, puis d'étudier chacun de ces derniers.

Nous étudierons aussi les lipides du caillé frais et du sérum du lait, aux premiers jours de fabrication du fromage, et par la suite pour élucider les changements de composition qu'ils ont subi au cours du caillage - égouttage et après mise en moule.

LA FABRICATION

Les éléments principaux entrant dans la fabrication sont successivement :

- Le lait entier de brebis
- Le levain des ferments lactiques
- La présure
- Le *Penicillium roquefortii*.

Le lait de brebis est versé dans des cuves (de 2 à 3 000 litres environ) où il reçoit de 5 à 10 et même parfois 20 ml du levain de ferments lactiques, et 20 ml en moyenne de présure par litre. Le caillage dure environ 1 heure, au bout de laquelle le caillé est découpé en petits morceaux et subit un égouttage préliminaire sur toile, avant la mise en moule. Au cours de cette dernière opération, le *Penicillium roquefortii* est ajouté sous forme de poudre de pain moisi (ou de suspension de spores) par saupoudrage et mélangé au caillé. Les moules remplis sont réunis par deux pour en former un seul, et retournés plusieurs fois pour parfaire l'égouttage; à la fin de cette opération, le volume de caillé est réduit à un seul moule. Une fois l'égouttage terminé, les pains de fromage sont transportés dans une salle à température et degré d'humidité déterminés, et subissent le salage.

Après quelques jours, ces pains seront expédiés aux caves d'affinage de Roquefort pour maturation. Avant la mise en cave, ils sont piqués avec des aiguilles particulières pour provoquer l'aération nécessaire au développement des moisissures internes. Ces dernières élaborent des protéases et des lipases qui jouent un rôle important dans l'affinage. Le rendement de fabrication du fromage de Roquefort est de 10 à 12 kg pour 100 litres de lait de brebis.

Le tableau X représente la fabrication des fromages en général, et démontre les phénomènes divers que l'on rencontre dans différents stades de fabrication et d'affinage.

TABLEAU X

La fabrication du fromage d'après C. ALAIS (1)

PHASES PRINCIPALES		ACTIONS et MODIFICATIONS
1. Maturation du lait (⁺ levain lactique)	Lait	- Développement limité de la microflore acidifiante et, parfois, d'une flore de microcoques préparant le "terrain".
2. Coagulation (caillage) + (présure)		- Formation du gel.
3. Décaillage et égouttage (± travail mécanique ou cuisson)	Caillé frais + Lactosérum	- Rupture du gel, accélération de la synérèse et séparation de la majeure partie de l'eau. Acidification lactique favorisant l'égouttage et inhibant certaines bactéries.
4. Mise en moule	Fromage frais	- Poursuite de l'égouttage et de la destruction du lactose; la teneur en eau doit s'approcher de la valeur optimale.
5. Salage	Fromage salé	- Ressuyage (complément d'égouttage). - Influence sur le goût. - Sélection des microorganismes. - Influence sur les activités enzymatiques.
6. Affinage	Fromage affiné	- Destruction complète du lactose. - Neutralisation de la pâte. - Perte d'eau. - Protéolyse et lipolyse avec formation de produits aromatiques. - Formation de la croûte.

A. LE LAIT DE BREBIS

Le lait de brebis d'aspect plus blanc que le lait de vache a une odeur et une saveur qui lui sont propres.

Si le lait de brebis n'a fait l'objet que d'un nombre assez limité de travaux, ceci pourrait tenir essentiellement aux faits suivants :

- La production est régionale et saisonnière.
- La brebis donne des quantités de lait très faibles par rapport à la vache (0,5 l à 0,8 l par jour).
- Enfin la traite des brebis est difficile.

Nous ne possédons actuellement que peu de données sur cette matière première de l'industrie du Roquefort. On sait que la composition chimique, biochimique, voire même microbiologique d'un lait varie avec la race de l'animal et la période de lactation.

Il nous semble donc utile de mentionner en passant la composition chimique moyenne des laits de brebis. (Tableau **XI**).

La lactation moyenne d'une brebis laitière est de 6 à 7 mois, généralement entre décembre et juillet.

La matière grasse du lait de brebis est l'élément le plus variable de ses principaux constituants. Dès la mise bas, le colostrum des brebis en est très riche avec 100 à 192 g par litre, puis vers le début du 2^{ème} mois de lactation, son taux oscille autour de 65 - 70 g; vient ensuite la période de pointe de production du lait et au 4^{ème} mois, alors que la quantité de lait décroît sensiblement, la matière grasse atteint 80 à 90 g par litre pour arriver en fin de lactation à des taux butyreux supérieurs à 100 et même 120. Il n'est pas rare, en année sèche, d'obtenir des laits de troupeaux en fin de

TABLEAU X I

Résumé des caractères analytiques des laits de brebis (race de Lacaune)

D'après STUDER P. (55)

EN GRAMMES PAR LITRE	MOYENNE	MINIMUM	MAXIMUM
Eau.....	840	805	870
Extrait sec total.....	200	170	235
Matières grasses	80	65	130
{ 2ème mois de lactation.....	65-70	55	80
{ 4ème mois de lactation.....	80-90	70	95
{ 5ème et 6ème mois de lactation....	90-105	80	130
Extrait sec dégraissé	120	114	129
Matières azotées (en protéines).....	62,10	54,14	76,44
Matières azotées (en azote total).....	9,75	8,5	12
{ 2ème mois de lactation.....	8,5-8,7	8	9
{ 4ème mois de lactation.....	10-10,5	8,5	11
{ 5ème et 6ème mois de lactation	11-12	10,5	12,5
Caséines	48	43	60
Albumines	8-9	7	10
Globulines	2-3	2	3
Sels minéraux	11	10	12
Cendres	9,5	8,5	10,5
Calcium en Ca	2	1,75	2,35
Phosphore en P	1,56	1,50	1,71
Ca / P	1,30	1,21	1,45
Chlorures (en Cl Na)	1,65	1,50	1,85
Constante moléculaire			
simplifiée rectifiée	76	72,5	83
Point de fusion de la matière grasse	29° C		
Point de solidification de la matière grasse	12° C		
Densité	1,038		
Acidité Dornic	20		
pH	6,60		
Indice de Reichert - Meissl	28,5	26,5	33
Indice de Polenske	5,8	4	8

lactation à 110 et même 130 g de matière grasse; il reste bien entendu que la concentration se fait au détriment de la quantité.

C'est la matière grasse qui donne au lait de brebis son odeur et sa saveur caractéristiques, elle est très blanche par rapport à celle du lait de vache, car elle est relativement pauvre en caroténoïdes, par contre elle est surtout riche en acides caprique (C_{10}) et caprylique (C_8). Ces deux acides gras correspondent essentiellement à l'indice de Polenske, et constituent l'essentiel de la fraction des "acides volatils insolubles dans l'eau" avec une partie de l'acide laurique (C_{12}). Les déterminations de ces acides sur les produits d'origine diverses prouvent bien qu'ils sont spécifiques de la brebis.

Les acides gras inférieurs de la matière grasse du lait de brebis, acides caprique et caprylique, ont une odeur forte particulière et par oxydation sont décomposés en produits aromatiques, les méthylcétones qui sont des composants importants de l'arôme de Roquefort.

1° Les phospholipides

La quantité moyenne des phospholipides du lait de brebis est supérieure à celle du lait de vache, mais malgré ceci, les proportions de lécithine, céphaline et sphingomyéline restent à peu près les mêmes dans tous les cas, c'est à dire respectivement : 30, 45 et 25. (Tableau **XII**)

La quantité totale des phospholipides du lait de brebis comme des autres ruminants domestiques varie suivant le taux de matière grasse du lait, la saison et la période de lactation. Les phospholipides du lait de brebis, contrairement à ceux du lait de vache, varient sensiblement suivant la race.

D'après une expérience de BALIGA et BASU (4), trois races de brebis : Bellary, Bikanir et Mandya avaient respectivement 51, 78 - 56, 67 et

TABLEAU **XII**

Valeurs moyennes des lécithines, céphalines et sphingomyélines et des phospholipides totaux dans les laits de vache, brebis, bufflonne et chèvre.

D'après BALIGA B.S. et BASU K.P. (4)

ESPÈCES	% des lipides du lait	mg pour 100 ml				% des phospholipides totaux			Phospholipides % des lipides du lait
		Lécithine	Céphaline	Sphingomyéline	Phospholipides totaux	Lécithine	Céphaline	Sphingomyéline	
Vache	4,4	9,93	14,29	7,16	31,37	31,6	45,5	22,9	0,7078
Bufflonne	6,7	7,29	9,12	4,63	21,03	35,2	42,8	22,1	0,3144
Brebis	8,1	17,95	26,10	14,93	58,51	30,8	45,0	24,2	0,7362
Chèvre	5,1	14,70	23,24	11,75	49,69	29,3	47,5	23,2	1,0268

61, 14 mg de phospholipides pour 100 ml de lait, toutefois le rapport des constituants des phospholipides entre eux a été le même dans les trois cas, c'est à dire 30; 45; 25.

Sur un échantillon de lait de brebis que nous avons reçu de Roquefort, les phospholipides ont été isolés, fractionnés, dosés, et les rapports des constituants obtenus se rapprochent de ceux donnés par les chercheurs précités.

L'extraction des lipides est effectuée par la méthode azéotropique à chaud. Les extraits bruts sont purifiés suivant le procédé de purification de FOLCH (double purification) et la teneur des lipides purs ainsi obtenus est : 62 g par litre de lait. L'échantillon de lait étant du début du 2^{ème} mois de lactation,

la teneur en lipides, comme on pouvait s'y attendre, est inférieure à la teneur moyenne qui est de l'ordre de 80 g par litre. La teneur de phosphore lipidique est en moyenne 0,0274 %.

Sur 4,35 g de ces lipides, les constituants phosphorés sont précipités par des traitements répétés à l'acétone, puis recueillis sur papier filtre et redissous dans le chloroforme.

Il est bien entendu que la séparation des lipides neutres et polaires ne peut pas être complète par ce moyen (49) et il y a toujours une quantité importante de lipides neutres qui accompagne les lipides polaires.

2° Chromatographie sur colonne d'acide silicique

Nous effectuons par partage sur colonne d'acide silicique, l'analyse de 197,7 mg des lipides ainsi traités et précipités par de l'acétone. Nous faisons l'élution au chloroforme progressivement enrichi en méthanol.

TABEAU XIII

Fractionnement des lipides du lait de brebis

ÉLUANTS	POIDS		PHOSPHORE		GROUPES
	mg	%	mg	%	
I Cl ₃ CH pur	165,4	85,56	0,00	0	Triglycérides - acides gras
II " + 5 % CH ₃ OH	5,7	2,95	0,10	8,7	Acides phosphatidiques
III " + 20 % "	6,5	3,36	0,36	30,1	Céphalines
IV " + 40 % "	3,9	2,01	0,21	18,4	Lécithines
V " + 60 % "	4,7	2,43	0,29	25,8	Lécithines - Lysolécithines Lysocéphalines
VI " + 80 % " + 4 % d'eau	7,1	3,66	0,19	16,6	Sphingomyélines
Total récupéré	193,3		1,13		
Total appliqué	197,7		1,16		
Rendement	97,77 %		97,84 %		

3° Chromatographie sur couche mince

Ce procédé est employé pour identifier les lipides polaires des différentes fractions. (PLANCHE ■ - Fig. 1)

Après révélation à l'iode, nous obtenons 6 taches numérotées de 1 à 6.

Le Spot n° 1 : de Rf 0,14, colorable à la ninhydrine (groupes aminés) et au réactif Dragendorff, élué dans la fraction à 60 %, est attribué à des lysocéphalines, lysolécithines et lyso-sphingomyélines.

Le Spot n° 2 : de Rf 0,23, colorable au réactif de Dragendorff, élué dans la fraction à 80 %, est attribué aux sphingomyélines.

Le Spot n° 3 : de Rf 0,33, colorable au réactif de Dragendorff, élué dans les fractions à 40 %, à 60 % et à 80 % correspond aux lécithines.

Les Spots n^{os} 4 et 4' : de Rf 0,52 et 0,57, colorables à la ninhydrine, élués dans la fraction à 20 %, sont attribués aux céphalines.

Le Spot n° 5 : de Rf à 0,73 est assimilé aux acides phosphatidiques ou à un glycolipide.

Le Spot n° 6 : de Rf 0,95 est attribué aux triglycérides.

D'après les résultats ainsi obtenus, nous pouvons faire le bilan des phospholipides du lait, comme suit :

TABLEAU **XIV**

% M. G.	mg % g DU LAIT				% des PHOSPHOLIP. TOTAUX			P PL (*)
	lécithine	céphaline	sphingo-myéline	Total	Lécithine	céphaline	sphingo-myéline	% M. G.
6,20	12,4	19,3	11,2	44	30,8	43,7	25,4	0,71

(*) Phospholipides

Les résultats de notre analyse se rapprochent de ceux obtenus par d'autres chercheurs, en particulier de BALIGA B.S. et BASU K.P. (4), que nous avons cité plus haut, compte-tenu bien entendu des écarts dûs à la période de lactation.

B. LES LEVAINS LACTIQUES

Un levain n'est pas simplement un apport d'acide lactique ; c'est une source de bactéries actives, capables de se multiplier au sein du lait, du caillé ou de la crème et de produire, au moment favorable, l'acidité et l'arôme recherchés.

Dans la sélection des souches lactiques, les propriétés suivantes sont prises en considération :

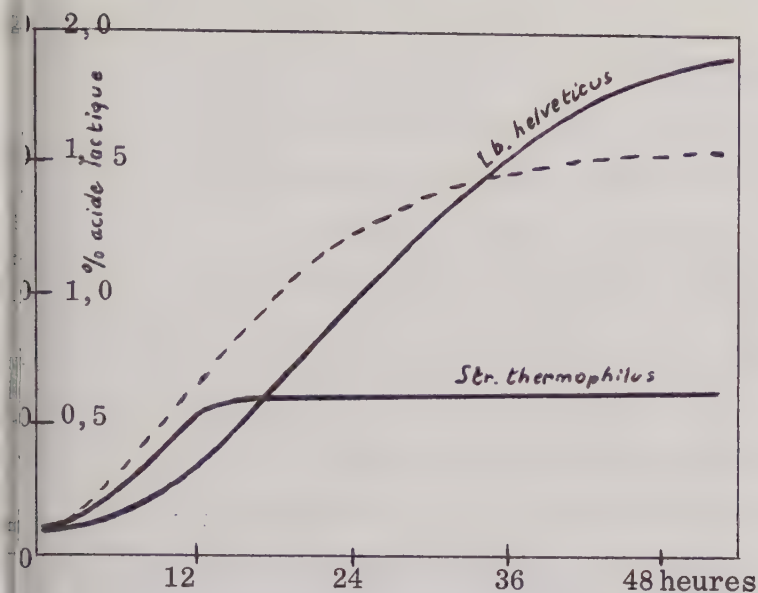
1° Température de croissance et d'activité

L'optimum ne coïncide pas toujours pour différentes activités; par exemple, certains streptocoques lactiques donnent un arôme plus prononcé à une température inférieure à l'optimum de croissance et d'acidification.

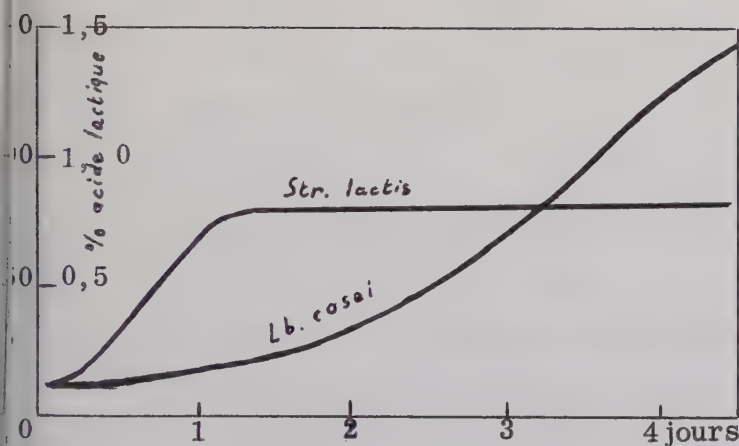
En beurrerie et en fromagerie de pâte molle ou fraîche, on utilise des espèces mésophiles actives entre 20 et 30° C, au contraire dans le cas du gruyère, on doit utiliser des espèces thermophiles. (Fig. 3).

2° Acidification

Le pouvoir acidifiant est en relation avec la résistance d'une souche dans les milieux acides; les streptocoques qui produisent 0,5 à 1 % d'acide et abaissent le pH vers 4,5 ne supportent pas l'acidification produite par les lactobacilles, ces derniers peuvent abaisser le pH jusqu'à 3,5. En ce qui



a) Culture d'espèces thermophiles, à 42°
(en pointillé, l'association des deux espèces)



b) Culture d'espèces mésophiles à 30°

Fig. 3 Courbes d'acidification de bactéries lactiques
(dans le lait stérilisé)

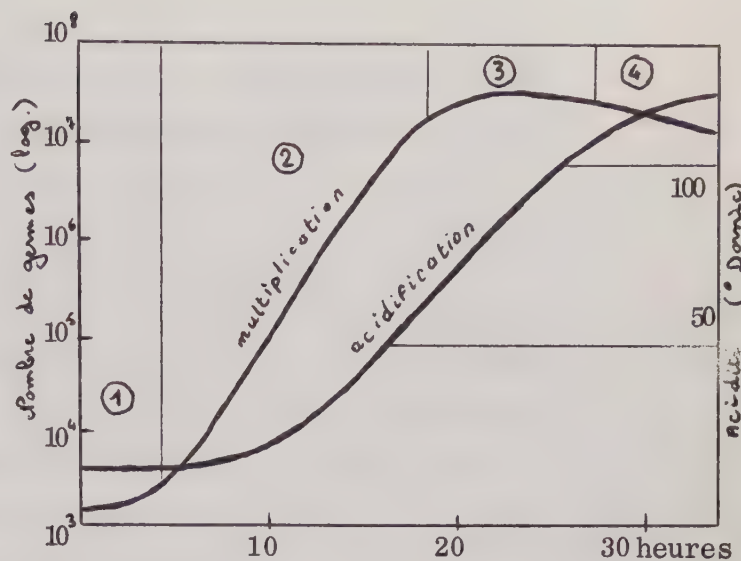


Fig. 4 Courbes de croissance et d'acidification d'une bactérie lactique

- (1) Phase de latence ou d'adaptation
- (2) Phase logarithmique (croissance active)
- (3) Phase du maximum ou stationnaire
- (4) Phase du déclin

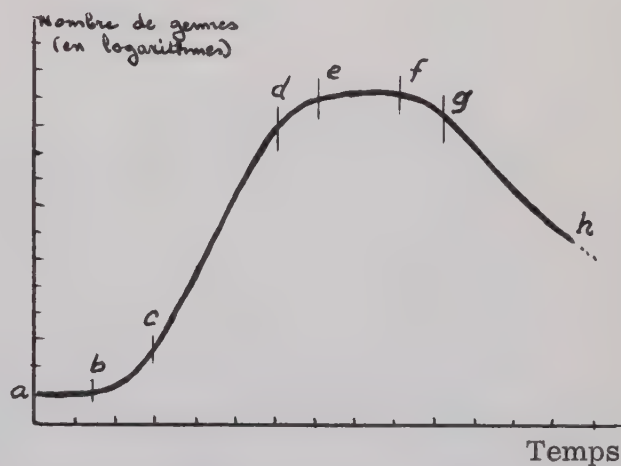
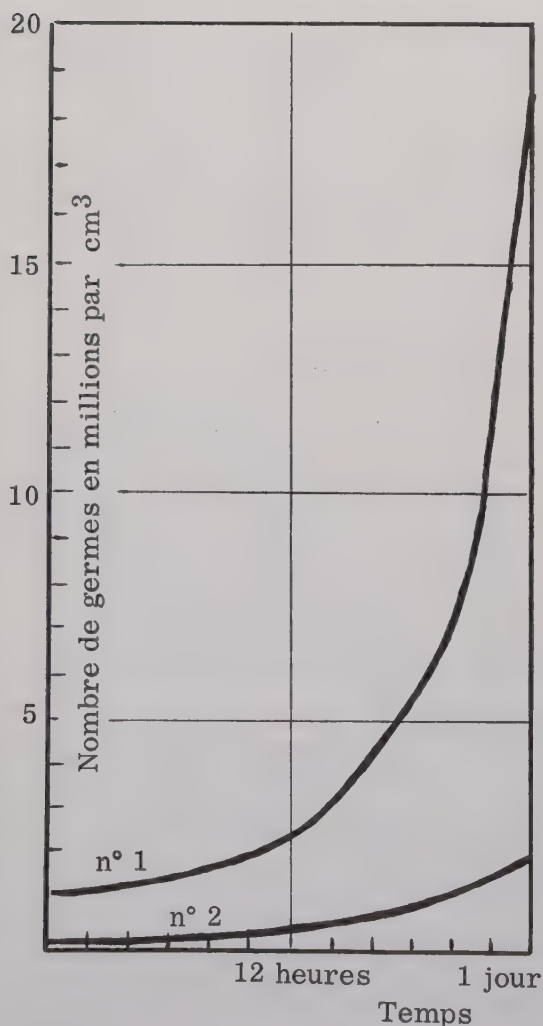


Fig. 5 D'après "Le lait et le froid" (22)

concerne la fromagerie, on a observé qu'il n'existait pas toujours de corrélation entre l'activité des bactéries cultivées sous forme de levain (acidité mesurée après 6 heures d'incubation) et l'évolution de l'acidité dans la cuve à fromage. La courbe de la figure 4 montre la succession des phases du développement microbien d'une part, et d'autre part le décalage de la courbe d'acidification. L'évolution générale d'une culture microbienne est montrée dans la figure 5.

La partie (ab) de la courbe correspond à la phase de latence ou d'adaptation, cette partie dépend du volume d'inoculum et de l'état physiologique des



bactéries : elle peut être très courte avec un inoculum important provenant d'une culture active (courbe n° 1) et inversement (courbe n° 2) (Fig. 6) La partie (bc) c'est la phase de départ et d'accélération de la croissance. (cd), la phase logarithmique de croissance, a une pente constante pour une souche donnée et un milieu donné; lorsqu'elle se ralentit (de) et qu'elle s'achève (ef), alors que le nombre de germes approche de son maximum, l'acidité est encore loin de sa valeur limite. La croissance atteint son taux maximal, alors c'est la phase stationnaire (ef); puis commence la phase du début de déclin de la culture (fg) et finalement la phase de déclin accéléré (gh). Ces trois dernières

Fig. 6 D'après "Le lait et le froid" (22)

phases correspondent, soit à l'épuisement du milieu en substances nutritives, soit à une concentration inhibitrice d'une substance résultant du métabolisme microbien, par exemple l'acide lactique.

3° La production des substances aromatiques

Dans le cas des souches employées en beurrerie et en fromagerie de pâte fraîche la production de diacétyl est particulièrement recherchée.

La variation de composition du milieu, notamment de la teneur en citrate, influence ce caractère des souches lactiques. (Fig. 7)

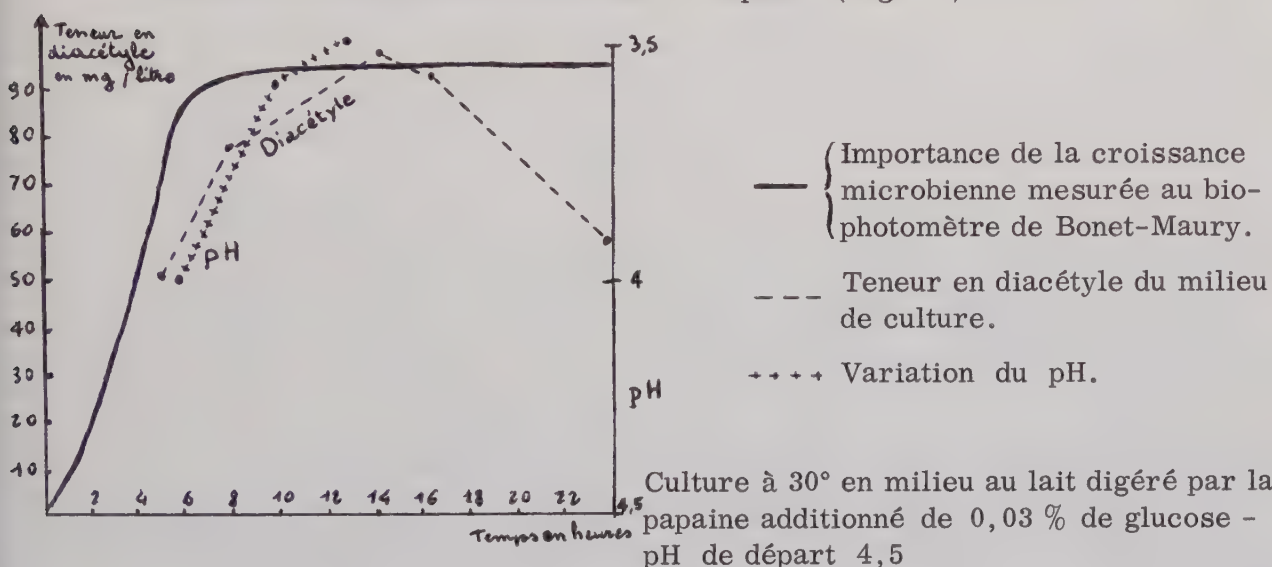


Fig. 7 D'après "Le lait et le froid" (22)

4° Activité protéolytique

Si les bactéries lactiques ont une action protéolytique très limitée dans la période de préparation et d'utilisation des levains, il n'en va pas de même dans le caillé de fromagerie où l'action de leurs protéases s'ajoute à celle de la présure pour dégrader les caséines. *Streptococcus lactis*, espèce commune des levains mésophiles, a une activité très faible par rapport aux lactobacilles.

Il y a encore d'autres caractéristiques des souches de ferments lactiques comme la variabilité des souches, la viscosité des cultures, la sensibilité aux phages, etc... que l'on doit prendre en considération en choisissant les souches.

La possibilité d'existence d'une sorte d'activité lipolytique chez les bactéries lactiques est un problème qui n'a pas été élucidé jusqu'à maintenant; nous en avons fait une étude systématique dont nous ferons état ultérieurement.

Dans la fromagerie, la souche originale des bactéries sélectionnées pour la préparation des levains lactiques est fournie par un laboratoire spécialisé sous forme de culture liquide (1 à 200 millions de germes par ml) de culture desséchée, qui n'est pas plus riche en bactéries que la première, et enfin de culture lyophilisée (1 milliard de germes par g).

Le volume de la première culture à préparer avec la souche originale dépend de l'activité de cette dernière, l'ensemencement moyen est de 0,5 % avec la culture lyophilisée et de 2 à 3 % avec la culture liquide ou desséchée.

- Repiquage : 5 % à partir du levain de la veille.
- Fabrication : les proportions varient avec le niveau d'acidité à atteindre, elles sont en moyenne de 3 à 5 % pour le yaourt et la crème, de 0,2 à 1 % pour la fromagerie.

ANALYSE DES FERMENTS LACTIQUES

Dans une boîte de poudre de ferments lactiques Proseca B, constituée en grande partie par des Str. lactiques, nous avons effectué des prélèvements en vue de déterminations de matière sèche totale et d'extraction des lipides.

Les taux de matière sèche trouvés sont :

99,11 %

98,68 %

99,32 %

98,55 %

Nous prenons le chiffre moyen de 98,9 %.

Une prise d'essai de 50 g de poudre de ferments lactiques, réhydratée par 20 ml d'eau distillée pendant 30 minutes, est épuisée à trois reprises par 250 ml de mélange de benzène - éthanol (200 ml + 50 ml) pour chaque épuisement suivant la méthode azéotropique à chaud; les résidus sont réhydratés après chaque extraction par 20 ml d'eau distillée pendant 30 minutes.

Les extraits lipidiques bruts réunis sont purifiés par la méthode de Folch (purification double ou croisée). Ces lipides sont extrêmement chargés en matières non lipidiques, le taux de surcharge s'élevant parfois jusqu'au voisinage de 50 % des lipides bruts.

Les lipides purs totaux obtenus sont de 0,2329 g pour 50 g correspondant à 4,75 mg de lipides purs par g de matière sèche totale.

Le phosphore lipidique, déterminé suivant la méthode colorimétrique de Macheboëuf et Delsal (32) est évalué à 0,17 %, correspondant à 4,25 mg de phosphatides exprimés en lécithine pour 100 mg de lipides purs, d'où un kg de ferments lactiques ne renfermerait que 200 mg de phospholipides.

C. LA PRÉSURE

La présure est un enzyme protéolytique sécrété par l'estomac des jeunes ruminants sous une forme inactive, la "proprésure". Elle est transformée en présure par un phénomène autocatalytique d'activation, accéléré par les ions H^+ comme dans le cas du pepsinogène.

Au cours de l'activation, des peptides riches en tyrosine formant la partie N-terminale, sont détachés de la proprésure; il s'ensuit une baisse du point isoélectrique de 5,0 (proenzyme) à 4,7 (enzyme). L'étude électrophorétique a montré l'existence de deux constituants de la proprésure : A et B. Après activation, la présure contient les deux constituants A et B, plus un troisième C, dont l'origine n'est pas connue. Ces trois constituants ne se distinguent dans l'état actuel de nos connaissances que par l'activité coagulante spécifique : elle est la plus élevée dans A et la plus faible dans C. (1)

La présure est une holoprotéine contenant 15 % d'azote; son poids moléculaire est voisin de 40.000. Elle est très sensible aux variations du pH. Elle ne coagule plus le lait légèrement alcalin (vers pH 7,4) et elle est irréversiblement inactivée à pH 8,0 (alors que le proenzyme résiste à des pH plus élevés). La présure conserve son activité protéolytique en milieu acide, mais en dessous de pH 4,8 elle est peu stable.

En pratique, on emploie diverses sortes de présure : l'extrait liquide de force 1 / 10.000 est le plus utilisé en France; la poudre de présure de force 1 / 100.000 ou 1 / 150.000 est plus pure au point de vue chimique et bactériologique, et conserve mieux son activité que la première, mais elle est une substance hygroscopique.

D. LE PENICILLIUM ROQUEFORTII

Les études des différents auteurs s'accordent pour reconnaître que le *Penicillium roquefortii* joue avec la flore lactique un rôle essentiel dans la maturation du Roquefort.

La plupart des souches de *Penicillium roquefortii* se cultivent bien en atmosphère chargée de CO₂ à 20 %; dans les mêmes conditions *P. glaucum* se développe mal, les variations importantes de pH n'inhibent pas son développement (2,0 à 9,0).

Les filtrats de *Penicillium* coagulent le lait et le digèrent ensuite plus ou moins rapidement, cette coagulation s'opère indépendamment des ions calcium solubles; le pH agit.

La moisissure sécrète une substance diastasique qui s'apparente aux protéases microbiennes. Les filtrats de *Penicillium* exercent une action stimulante sur certains germes et en particulier la flore lactique des laits. (Fig. 8)

Lorsqu'on se trouve en présence d'une association microbienne, on constate que la densité d'un des éléments par rapport à l'autre est très souvent modifiée par addition de filtrat de moisissure. Si nous considérons l'association ferment lactique — *aerobacter* aérogènes en culture dans le lait avec et sans filtrat, il faut remarquer que le pourcentage de ce dernier considéré à un moment quelconque est toujours plus faible en présence du filtrat, et que *aerobacter* aérogènes dans ces conditions est plus rapidement détruit qu'en culture normale. (Fig. 9)

1° Rôle et importance du *Penicillium* dans la maturation du fromage de Roquefort

Le *Penicillium* vivant à l'intérieur du fromage élabore un certain nombre de diastases, en particulier deux systèmes enzymatiques distincts :

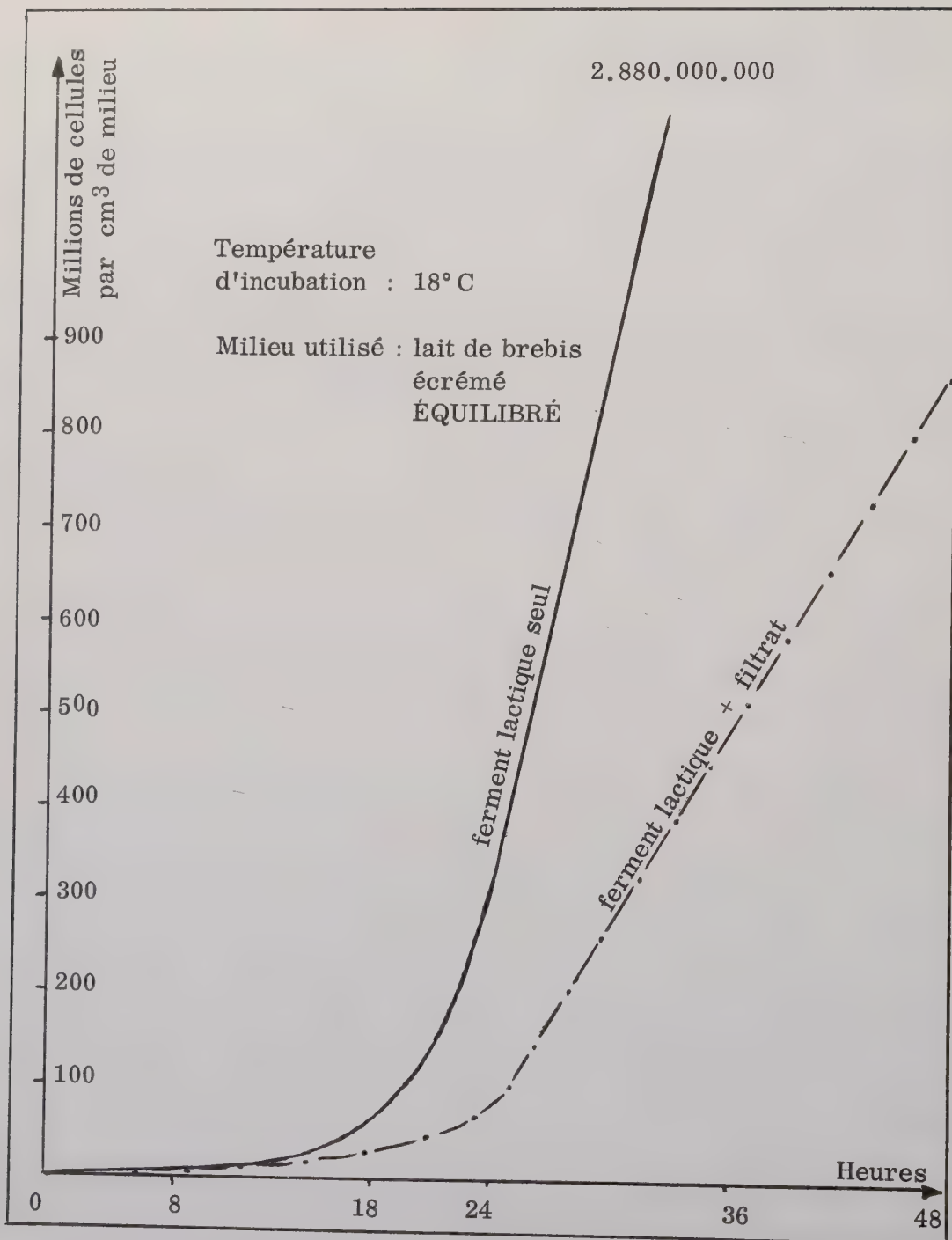


Fig. 8 - Evolution moyenne des cultures de ferments lactiques avec et sans filtrat de *Penicillium*.

D'après H. DUTHEIL (12)

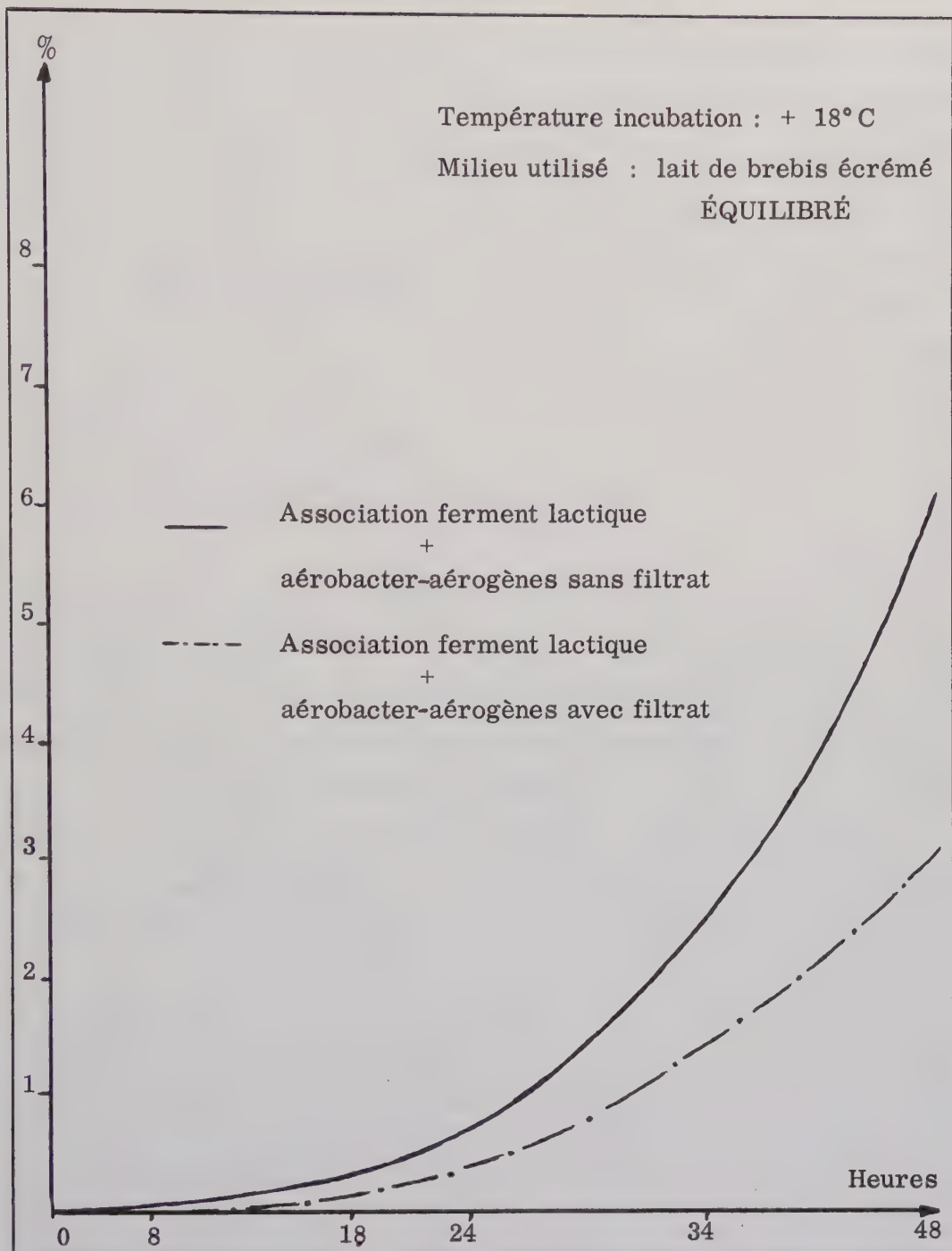


Fig. 9 - Variations du nombre d'aérobacter-aérogènes type I pour 100 ferments lactiques dans l'association en culture de ces deux germes avec et sans filtrat de *Penicillium*.
D'après H. DUTHEIL (12)

une estérase et une lipase. Tous deux hydrolysent les liaisons esters, mais l'estérase n'agit que sur des esters solubles (tributyryne, triacétine, acétate d'éthyle, tween...) alors que la lipase n'agit qu'à l'interface lipide - eau. Il est possible que les estérases jouent un certain rôle en fin de l'affinage au moment où le pH étant suffisamment haut, des acides gras libres peuvent se recombinaer avec des alcools autres que le glycérol (méthanol, éthanol, butanol, pentanol).

La chromatographie a montré qu'en fin d'affinage il y a dans le fromage beaucoup d'esters solubles (butyrate de méthyle, acétate d'éthyle, propionate d'éthyle, etc...) et qui participent à la formation du goût et de l'arôme du fromage. (1)

A la différence de la protéolyse, l'intensité de la lipolyse est très faible dans le fromage, et pourtant ses effets sont considérables (goût Roquefort, saveur piquante). En effet, dans un fromage affiné 50 % environ de la caséine est dégradée alors que la lipolyse ne libère que 1 à 5 % des acides gras totaux, ce qui rend délicate la mesure des activités lipolytiques (52).

La réaction d'hydrolyse enzymatique des triglycérides dans le fromage de Roquefort par la lipase de *Penicillium* est très difficile à reproduire in vitro, les conditions mêmes de la réaction influant sur les résultats de la lipolyse.

Le *Penicillium roquefortii* se présente sous forme d'une poudre de couleur bleu vert, provenant d'un pain spécial à base de seigle et de blé, moisi dans certaines conditions. Le mélange est désigné communément sous le nom de "pain moisi", et il est constitué essentiellement par des spores de *Penicillium*, des thalles et divers déchets apportés par le pain, la qualité du produit étant d'ailleurs très variable suivant les conditions de la préparation.

Henri DUTHEIL (12) a comparé plusieurs méthodes pour la détermination de l'extrait sec des poudres de *Penicillium* et il trouve que la meilleure méthode est l'utilisation de l'infra-rouge qui, outre des résultats constants et fidèles, n'altère pas la matière.

2° Analyse des lipides

Sur un échantillon de poudre de *Penicillium* de vitalité 80 %, qui nous a été fourni par la Société des Caves réunies de Roquefort, nous avons effectué l'extraction et l'analyse des lipides. Les résultats des analyses chimiques figurent sur le tableau suivant.

TABLEAU **XV**

Extraction et analyse des lipides de *Penicillium roquefortii*

MÉTHODES	% M.S.	% M.G.	% P lipidiques	N / P
AZÉO. DOUBLE	90,70	3,08	0,61	1,30
	91,47	2,70	0,37	-
moyenne :	91,08	2,89	0,49	1,30
A FROID	90,15	2,69	0,51	2
	90,70	2,86	0,46	1,33
	91,47	2,65	0,34	-
moyenne :	90,74	2,73	0,44	1,66

3° Chromatographie sur colonne d'acide silicique

Les lipides purs obtenus sont traités à deux reprises par 50 ml d'acétone à 0° C, les phospholipides précipités sont recueillis sur papier filtre, lavés à nouveau par de l'acétone, puis redissous dans le chloroforme. 125,6 mg de ces lipides sont appliqués sur la colonne d'acide silicique pour le fractionnement des phospholipides. (Tableau **XVI**)

TABLEAU **XVI**

Fractionnement des lipides de *Penicillium roquefortii*

ÉLUANTS	POIDS		PHOSPHORE		GROUPES
	mg	%	mg	%	
I CH Cl ₃ pur	55,1	48,03	0,00	0,00	Triglycérides - acides gras
II " + 5 % CH ₃ OH	19,2	16,73	0,20	31,3	Acides phosphatidiques
III " + 20 % "	23,8	20,74	0,15	23,5	Acides phosphatidiques, Glycolipides
IV " + 40 % "	4,4	3,83	0,04	5,6	Céphalines (+ acides phosphatidiques)
V " + 60 % "	7,2	6,27	0,16	26,0	Lécithines
VI " + 80 % " + 4 % d'eau	5,0	4,35	0,08	13,00	Lécithines
Phosphore total appliqué : 0,64 mg					
Phosphore total récupéré : 0,63 mg					
Rendement : 98 %					

4° Chromatographie sur couche mince

L'identification des lipides fractionnés sur colonne d'acide silicique est effectuée par la chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le système solvant employé est $\text{Cl}_3\text{CH} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ 65 - 25 - 4 V/V qui fractionne les lipides polaires tandis que les lipides neutres migrent au front. (PLANCHE ■ Fig. 2)

Après la révélation à l'iode, nous observons 7 taches principales numérotées de 1 à 7.

Le spot n° 1 : de Rf 0,4, colorable au réactif de Dragendorff, correspond aux lécithines; il est élué dans les fractions à 60 % et 80 %.

Les spots n°^{OS} 2 et 3 : de Rf 0,53 et 0,60 colorable à la ninhydrine et à l' α -naphtol, élués dans la fraction à 40 %, sont attribués aux céphalines et peut-être aussi à un glycolipide.

Le spot n° 4 : de Rf 0,78, élué faiblement dans la fraction à 20 % colorable à l' α -naphtol, semble être un glycolipide.

Le spot n° 5 : de Rf 0,87 est attribué aux acides gras libres.

Le spot n° 6 : de Rf 0,94 serait assimilé aux acides phosphatidiques, élué dans les fractions à 5 %, à 20 % et surtout à 40 %.

Le spot n° 7 : de Rf 0,97 est attribué aux triglycérides.

5° Discussion

D'après ces analyses, les phospholipides de *Penicillium roquefortii* sont particulièrement riches en lécithines et acides phosphatidiques; les céphalines y sont présentes en faible quantité, nous n'avons pas constaté la présence de sphingomyélines, ni de composés lyso.

La teneur des lipides du *Penicillium* en phospholipides est à peu près 8 %, et la teneur de la poudre de *Penicillium* en ces mêmes constituants sera donc de l'ordre de 2,30 mg par g de matière sèche. Bien entendu, ces chiffres sont des ordres de grandeur, la quantité exacte étant variable d'une souche à l'autre.

E. LE CAILLAGE ET LE CAILLÉ FRAIS

Le lait emprésuré à une température moyenne comprise entre 20 et 40°, abandonné à lui-même, se transforme au bout d'un certain temps en un gel homogène tel que le coagulum occupe tout le volume initial.

Le coagulum frais homogène représente un état métastable. La synérèse est la rétraction du réseau régulier formé par les protéines coagulées, renfermant les globules gras et le sérum. Ce dernier se sépare plus ou moins rapidement selon les influences qui s'exercent; il s'agit principalement des changements de température, des actions mécaniques et de l'acidification se produisant au sein du coagulum.

Nous savons que la coagulation peut s'effectuer soit sous l'influence de la présure, soit sous l'action de l'acidification spontanée. Le tableau **XVII** résume les notions concernant ces deux modes de coagulation.

Le chlorure de calcium est employé comme adjuvant de coagulation, d'une façon irrégulière avec les laits crus, d'une façon régulière avec les laits pasteurisés. Un excès de chlorure de calcium (plus de 20 g pour 100 litres) est inutile au point de vue de la coagulation, il est dangereux en raison du risque d'apparition d'un goût amer.

TABLEAU **XVII**

Caractéristiques des deux modes habituels de coagulation du lait
D'après C. ALAIS (1)

	COAGULATION PAR :	
	Action de la présure	Acidification spontanée
Processus biochimique...	Action enzymatique (lactose non dégradé).	Fermentation lactique aux dépens du lactose.
Modification de la caséine.....	Transformation en paracaseïne, séparation d'une partie non protéique.	Pas de modification chimique de la protéine elle-même.
pH.....	6,8	4,6
Composition du coagulum	Phospho-paracaseinate de chaux	Caséine pure (deminéralisée)
Nature du coagulum....	Gel élastique imperméable	Caillé friable, sans cohésion
Synérèse (rétraction naturelle du caillé et expulsion du sérum) ...	Rapide	Lente

Il semble que la fixation de la valeur du pH du lait et de la température au moment de la coagulation ait une grande importance et que $1/10^e$ de degré ou $1/20^e$ d'unité de pH en plus ou en moins puisse modifier sensiblement la qualité du caillé.

1° L'égouttage

Le travail mécanique appliqué au caillé accélère l'égouttage.

Il peut être très limité avec des caillés lactiques. Il est plus complexe et plus poussé avec les caillés "présurés", car leur égouttage spontané serait très long.

Les techniques du travail mécanique sont diverses dans le cas du caillé de Roquefort. Il consiste en un découpage du caillé en morceaux cubiques dans la cuve, en égouttage préliminaire sur toile, puis mise en moule (et addition de poudre de *Penicillium*) avec retournement des moules à intervalles réguliers; lorsque le fromage est assez ferme dans le moule, on procède au démoulage, ensuite le fromage est transporté dans les locaux réservés au salage, puis dans les caves d'affinage de Roquefort, après avoir été piqué par de grosses aiguilles pour l'aération interne du fromage.

Après l'égouttage, le fromage contient un nombre de bactéries qui est en général très élevé, il peut atteindre plusieurs milliards par gramme. Les bactéries lactiques dominent normalement.

Au début de l'affinage les streptocoques lactiques sont nombreux; ils disparaissent ensuite progressivement; leur rôle dans l'affinage paraît très réduit.

Les lactobacilles prédominent après les streptocoques. Nous savons qu'ils produisent des enzymes protéolytiques et lipolytiques endocellulaires; ces enzymes passent dans le milieu après la mort des bactéries; ils jouent un rôle important dans l'affinage des fromages qui n'ont pas une microflore superficielle active (cas du fromage de Roquefort). La flore lactique diminue en nombre de façon très sensible dans les quelques jours qui suivent la fabrication. (Fig. 11)

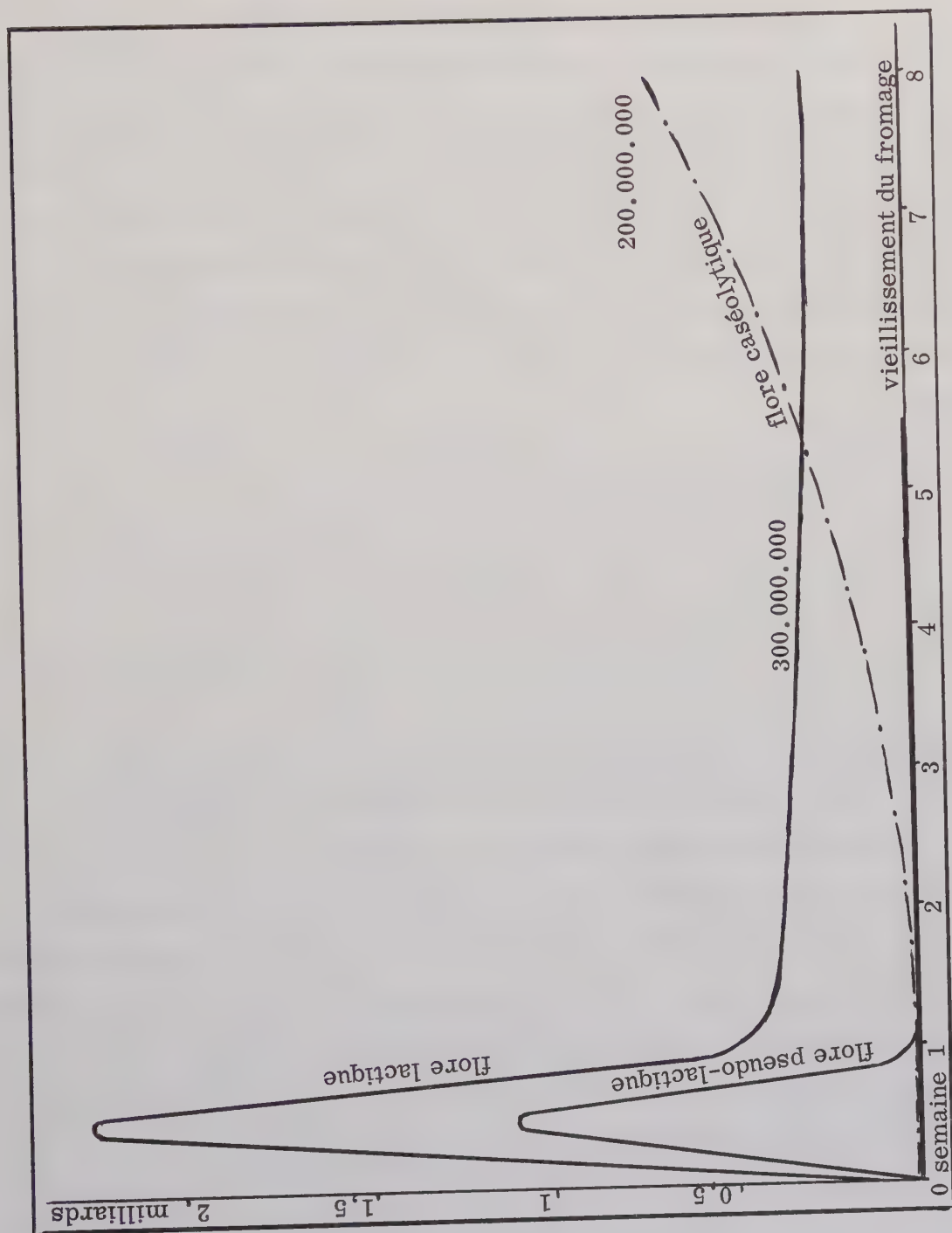


Fig. 11 - Evolution de la flore dans le fromage. D'après H. DUTHEIL (12)

2° Distribution des constituants du lait

Le caillé égoutté retient approximativement la moitié en poids de l'ensemble des constituants du lait, formant l'extraît sec total. La caséine et les matières grasses sont presque entièrement retenues dans le caillé; les autres constituants sont retenus en quantité proportionnelle à la teneur en eau du caillé, c'est-à-dire au lacto-sérum qui n'a pas été expulsé au cours de l'égouttage.

Un échantillon de caillé de lait de brebis qui nous a été fourni par la Société des Caves réunies de Roquefort a été analysé le jour même de sa fabrication.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Matière sèche	41 %
Matière grasse	21,2 %
M.G. / M.S.	53 %
Phosphore lipidique	0,028 % de lipides
N / P.....	≈ 2

3° Chromatographie sur colonne d'acide silicique

Sur une partie des lipides obtenus, les constituants non phosphorés sont éliminés par dissolution dans l'acétone, le taux de phosphore des lipides neutres obtenus n'est alors que de 0,007 %. 187 mg de lipides précipités par l'acétone, contenant 0,304 % de phosphore soit 0,565 mg de phosphore total, sont introduits dans la colonne d'acide silicique. Le fractionnement est effectué par élution au chloroforme, progressivement enrichi en méthanol.

Les résultats obtenus figurent sur le tableau **XVIII.**

TABLEAU **XVIII**

Fractionnement sur colonne d'acide silicique des phospholipides
de caillé frais de Roquefort

ÉLUANTS	POIDS		PHOSPHORE		GROUPES
	mg	%	mg	%	
I Cl_3CH pur	165	90,16	0,00	0	Lipides neutres
II " + 5 % CH_3OH	7,6	4,15	0,15	27,2	Acides phosphatidiques
III " + 20 % "	3,3	1,80	0,13	23,6	Céphalines
IV " + 40 % "	1,4	0,76	0,05	9,1	Colaminocéphalines + Lécithines
V " + 60 % "	1,3	0,71	0,05	9,1	Lécithines + Lysolécithines
VI " + 80 % + 4 % d'eau	4,4	2,40	0,17	31,0	Sphingomyélines
Total récupéré	183		0,55		
Total appliqué	187		0,56		
Rendement	97,8 %		97,3 %		

Avec la chromatographie en couche mince, nous séparons les différents groupes des phospholipides de chaque éluat par un système ascendant de $\text{Cl}_3\text{CH} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ 65 - 25 - 4 V/V. L'identification est effectuée après la révélation aux vapeurs d'iode. Les spots obtenus sont numérotés de 1 à 5. (PLANCHE ■ Fig. 3)

Le bilan des phospholipides de caillé est résumé dans le tableau suivant :

TABLEAU **XIX**

% M. G.	mg pour 100 g DE CAILLÉ				% des PHOSPHOLIP. TOTAUX			PHOSPHO-LIPIDES % de M. G.
	lécithine	céphaline	sphingo-myéline	Total	lécithine	céphaline	sphingo-myéline	
21, 23	16, 4	95, 4	36, 1	148	11, 1	65, 5	24, 4	0, 70

LACTOSÉRUM

Nous avons analysé le lactosérum expulsé du caillé, durant le temps qui s'est écoulé entre le prélèvement de l'échantillon de caillé dans la fromagerie et l'analyse proprement dite.

L'échantillon A représente le lactosérum expulsé le 1^{er} jour et l'échantillon B représente celui du 2^{ème} jour après réception.

TABLEAU **XX**

Extraction et analyse des lipides de lactosérum

ÉCHANTILLONS	% M.S.	g / 1 M. G.	M. G. / M.S. %	% PHOSPHORE LIPIDIQUE
A	7, 73	1, 93	2, 51	0, 09
B	7, 73	1, 72	2, 23	0, 09
Moyenne	7, 73	1, 82	2, 37	0, 09

F. EXTRACTION ET ANALYSE DES LIPIDES DU FROMAGE **DE ROQUEFORT**

Sur 93 g d'un échantillon de fromage de Roquefort du commerce ayant 57,75 % d'extrait sec total, broyé au mortier, nous extrayons la majorité des lipides neutres, par deux épuisements successifs à + 2° C (chambre froide) et pendant 5 minutes à l'aide de 800 ml d'acétone (au total). Nous obtenons ainsi 17,30 g de lipides purs avec un taux de 0,01 % de phosphore lipidique.

Les résidus réhydratés par quelques dizaines de ml d'eau sont épuisés à deux reprises, suivant le procédé azéotropique à chaud (26) par 400 + 100 ml de mélange benzène - éthanol pour la première et 1000 + 250 ml de ce même mélange pour la deuxième extraction.

La durée de chaque épuisement est d'une heure. On obtient ainsi 14,10 g de lipides purs totaux avec 0,02 % de phosphore lipidique.

Les matières grasses totales extraites par les quatre épuisements représentent un taux de 33,76 % par rapport au fromage initial et environ 58 % par rapport à la matière sèche.

1° Chromatographie sur colonne d'acide silicique

Sur une partie des lipides extraits par la méthode azéotropique à chaud, les lipides neutres sont éliminés par dissolution dans l'acétone.

Les précipités plus riches en composés phosphorés (0,064 % de phosphore lipidique) sont recueillis sur papier filtre dégraissé et lavés de nouveau à l'acétone.

181,6 mg de ces lipides sont introduits dans une colonne d'acide silicique et fractionnés par le chloroforme progressivement enrichi en méthanol. Les résultats obtenus figurent sur le tableau **XXI**.

TABLEAU **XXI**

Fractionnement des lipides de fromage de Roquefort

ÉLUANTS	POIDS		PHOSPHORE		GROUPES
	mg	%	mg	%	
I $\text{Cl}_3 \text{CH}$ pur	161,7	92,18	0,00	0	Lipides neutres
II " + 5 % $\text{CH}_3 \text{OH}$	9,2	5,25	0,09	72	Acides phosphatidiques
III " + 20 % "	0,9	0,51	0,02	20	Céphalines
IV " + 40 % "	1,9	1,08	0,02	18	Colaminocéphaline
V " + 60 % "	1,0	0,57	-	-	Lécithines
VI " + 80 % " + 4 % d'eau	0,7	0,40	-	-	Lécithines + Sphingomyélines
Total récupéré	175,4		0,130		
Total appliqué	181,6		0,135		
Rendement	96,6		96,3		

Par la chromatographie sur couche mince de gel de silice et révélation des taches aux vapeurs d'iode, nous obtenons 6 taches (PLANCHE **II** Fig. 4) qui sont identifiées comme dans les cas précédents.

Le bilan des phospholipides de fromage de Roquefort est représenté dans le tableau **XXII**.

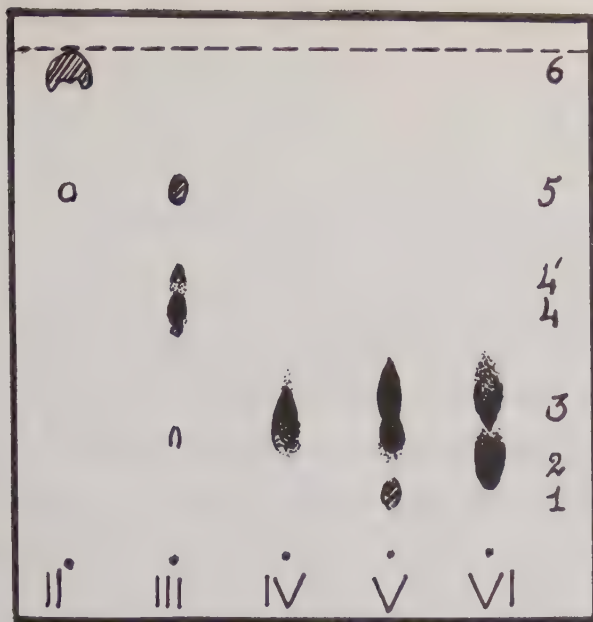


Fig. 1 - Lait de brebis

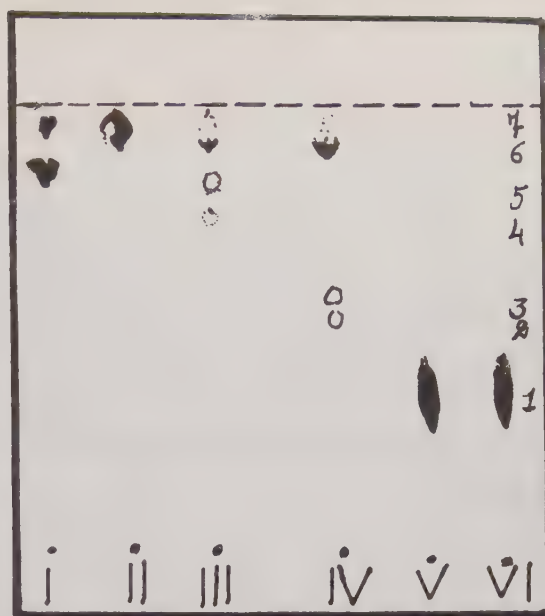


Fig. 2 - *Penicillium roquefortii*

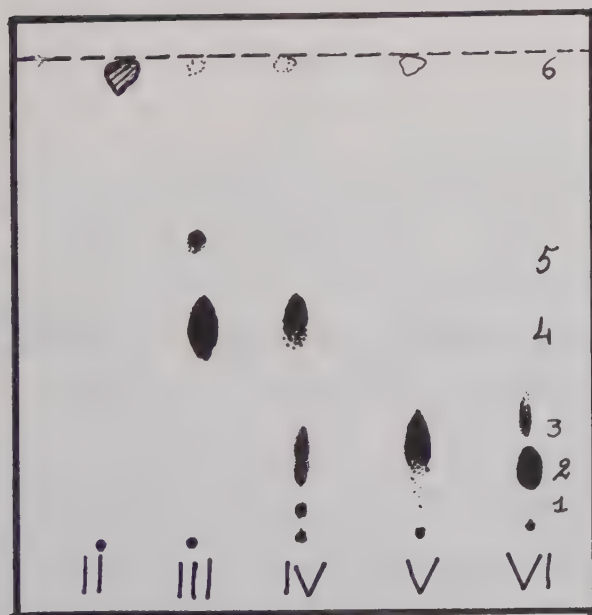


Fig. 3 - Caillé frais de Roquefort

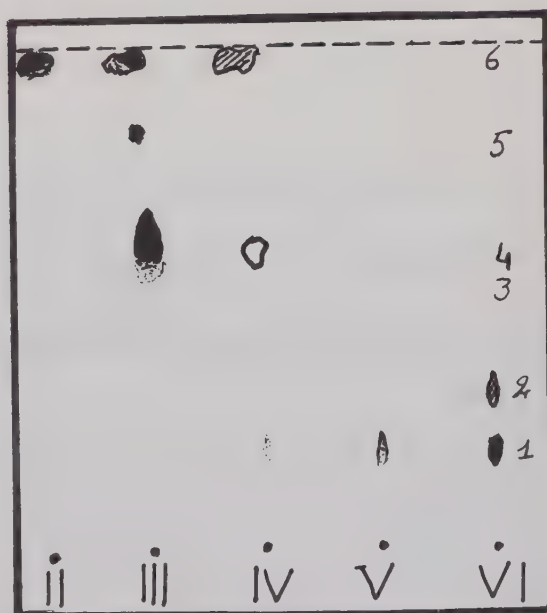


Fig. 4 - Fromage de Roquefort

PLANCHE ■ : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Système : Chloroforme - méthanol - eau 65 / 25 / 4 V / V

Révélation à l'iode.

TABLEAU **XXII**

% M. G.	mg pour 100 g DE FROMAGE				% des PHOSPHOLIP. TOTAUX			PHOSPHO-LIPIDES % de M. G.
	lécithine	céphaline	sphingo-myéline	Total	lécithine	céphaline	sphingo-myéline	
33,70	11,0	132,3	7,7	151	7,3	87,6	5,1	0,45

G. DISCUSSION

Sur le tableau **XXIII** nous avons comparé la quantité des phospholipides pour 100 g de matière grasse, et la répartition de chaque groupe par rapport aux phospholipides totaux dans le lait, le caillé et le fromage.

TABLEAU **XXIII**

MATÉRIEL	% des PHOSPHOLIPIDES TOTAUX			PHOSPHOLIPIDES	
	lécithine	céphalines (*)	sphingomyéline	% M. G.	en mg pour 100 g du matériel
LAIT	30,8	43,7	25,4	0,71	44
CAILLÉ	11,1	65,5	24,4	0,70	148
FROMAGE	7,3	87,6	5,1	0,45	151

(*) Les "céphalines" englobent les acides phosphatidiques et les céphalines.

On constate d'après le tableau **XXIII** que le taux des phospholipides totaux diminue progressivement au cours de la fabrication, l'affinage et la maturation du fromage. D'autre part, nous constatons que la fraction la plus dégradée est la lécithine qui se manifeste dès la fabrication de caillé. Malheureusement, nous ne disposons pas d'assez de temps pour pouvoir identifier les produits de dégradation des lécithines.

E. KAHANE et J. LÉVY (25) ont montré une augmentation sensible de choline hydrosoluble combinée et non de la choline libre pendant la conservation du lait en absence d'antiseptiques.

J. ÉTIENNE et J. POLONOVSKY (13), lors de l'incubation du sérum humain à 37° pendant 72 heures observent une diminution du taux de phosphore et de choline lipidique qui est d'ailleurs en accord avec la baisse du taux d'acides gras observé par LEBRETON et PANTALÉON (28). Le phénomène s'accompagne de la libération d'une substance qui a été identifiée à la "glycérylphosphorylcholine" par chromatographie et électrophorèse. Ils ont par ailleurs établi que les lécithines seules sont touchées et leur dégradation peut atteindre 40 pour 100.

BORDAS et RACZOWSKY (5) observent une diminution des lécithines dans le lait chauffé. PERLMAN (39) n'observe ce phénomène que dans la mesure où les bactéries pullulent dans le lait.

Les expériences de PERLMAN résumées dans le tableau **XXIV** démontrent l'importance du rôle qu'y jouent les bactéries lactiques dans la dégradation des phospholipides.

TABLEAU **XXIV**

La dégradation des phospholipides d'après PERLMAN

Phospholipides en mg pour 100 ml de lait					Phospholipides en mg % du lait additionné de 1 ml de culture microbienne	
lait cru	pasteurisé 60-65°/30 mn	120-125°/15 mn	120-125°/30 mn	37°/48 h	37°/24 h	37°/48 h
30,1	29,1	30	30,5	31	13,5	10,8

Il y a donc lieu de croire que la dégradation des phospholipides constatée dans le caillé et le fromage de Roquefort est parallèle au développement des bactéries au sein de ces matériaux. Pour éclaircir ce point obscur, nous essayons de reproduire le phénomène in vitro par l'incubation de lait stérilisé ensemencé par les bactéries lactiques à 37°.

CHAPITRE III

A. ÉVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES AU COURS DE L'INCUBATION DU LAIT ENSEMENCÉ PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES.

Nous utilisons comme matière première le lait stérilisé homogénéisé du commerce.

La poudre de ferment lactique : "Streptococcus lactis" nous a été fournie par les Etablissements Proseca. 1 g de cette poudre a été mis en suspension dans de l'eau distillée stérile, puis incubé à 37° pendant 30 mn pour réactiver les bactéries.

Les prises d'essais de 20 ml de lait stérilisé dans des erlenmeyers de 100 ml ont étéensemencées par 1 ml de la suspension précédente. A côté de ceux-ci, nous faisons aussi incuber des prélèvements de 20 ml de ce même lait, sans ensemencement, comme témoins.

Nous avons fait des incubations durant des temps variés (0, 4 et 24 heures) au bout desquelles les prises d'essais sont épuisées suivant le procédé d'extraction azéotropique.

Sur les lipides purifiés obtenus, nous avons dosé le phosphore lipidique par la méthode colorimétrique (32); les résultats de cette première série d'incubation figurent sur le tableau suivant :

TABLEAU **XXV**

T = Témoins

F = Ensemencé avec ferments lactiques

	0		4 heures		24 heures	
	T	F	T	F	T	F
g de lipides / 20 ml de lait	0,65	0,65	0,65	0,65	0,66	0,67
γ de phosphore / g de lipides	225	227	203	132,6	221	204
% de dégradation de phosphore lipidique	0 %		34,7 %		7,2 %	

On constaterait d'après le tableau ci-dessus que la dégradation des phospholipides atteindrait son maximum au cours de l'incubation de 4 heures, puis s'abaisserait si l'incubation est prolongée.

Le broyat de bactéries (15 g de poudre de ferment lactique broyées avec 250 ml d'eau distillée) a une activité semblable aux bactéries vivantes mais moins rapide, de sorte que au cours des incubations de 4 et 8 heures, il n'y a pas de dégradations. On utilise 2 ml de broyat pour 20 ml de lait.

L'intensité de la dégradation n'est guère plus prononcée que dans le cas précédent, comme il est présenté dans le tableau suivant :

TABLEAU **XXVI** (*)

	24 heures		30 heures		48 heures		72 heures	
	T	F	T	F	T	F	T	F
g de lipide / 20 ml de lait	0,64	0,64	0,65	0,64	0,65	0,65	0,65	0,66
γ de phosphore lipidique	296	209	295	228	272	173	280	208
% de dégradation de phosphore lipidique	27,4 %		22,7 %		36,4 %		29,3 %	

(*) Nous remercions vivement Monsieur A. CERVONI et Mademoiselle C. CHICHE pour leur aide.

Une autre souche de ferments lactiques, le *Lactobacillus acidophilus*, poudre lyophilisée très pure et sans support, donc très fragile, présentant plus de 4 milliards de germes par gramme, nous a été fournie par le laboratoire Lyocentre. Nous avons préparé une suspension de cette poudre (1 g / 20 ml d'eau) et nous avonsensemencé les prises d'essais de 20 ml de lait stérile par 1 ml de cette suspension sans réactivation préalable.

Etant donné le caractère anaérobie facultatif de ces bactéries (micro-aérophiles), les incubations sont effectuées dans des tubes à essai de 50 ml bouchés avec du coton.

Cette bactérie est thermophile et pousse bien à 45°C, mais au-dessous de 35°C elle ne pousse plus. Nous avons effectué d'abord une série d'incubations à 37°C dont les résultats sont représentés sur le tableau suivant :

TABLEAU **XXVII**

	0		1 heure		4 heures		24 heures		72 heures	
	T	F	T	F	T	F	T	F	T	F
g de lipide / 20 ml de lait	0,66	0,64	0,66	0,64	0,66	0,63	0,66	0,66	0,66	0,67
γ de phosphore / g de lipide	206,5	206	192	167	201	162,5	191,3	175,2	187	143
dégradation %	0,2 %		16,7 %		18,8 %		8,4 %		2,3 %	

La deuxième série d'incubations est effectuée à 40°C avec le lait restérilisé à 115 - 120°C pendant 15 - 20 minutes et les résultats obtenus figurent sur le tableau **XXVIII**.

TABLEAU **XXVIII**

	0		2 heures		4 heures		6 heures		8 heures		24 heures	
	T	F	T	F	T	F	T	F	T	F	T	F
g de lipide / 20 ml de lait	0,66	0,65	0,66	0,65	0,66	0,63	0,65	0,64	0,65	0,65	0,65	0,62
γ de phosphore / g de lipide	197	195	196,5	170	154	113,5	150	135	195	183,3	193	182,4
dégradation %	1 %		13,7 %		26,3 %		6,3 %		6 %		5,5 %	

DISCUSSION

Au cours de nos essais sur le lait stérilisé, nous constatons une dégradation des phospholipides dans les échantillonsensemencés par des bactéries lactiques, qui se traduit par l'abaissement du taux de phosphore lipidique. Sous l'influence de *Streptococcus lactis* la dégradation est plus poussée que sous l'influence de *Lactobacillus acidophilus*.

D'autre part, avec le broyat de *S. lactis*, la dégradation ne se manifeste pas avant le temps d'incubation de 24 heures, et son maximum est atteint après 48 heures.

Il paraît donc probable que l'enzyme dégradant les phospholipides est produit par les bactéries au cours de leur activité vitale.

D'après la courbe de croissance des bactéries lactiques (Fig. **4** et **5** la période de dégradation maximale coïncide avec la phase de latence des bactéries. Il serait donc possible que pendant cette phase, pour pouvoir fournir les éléments phosphorés nécessaires à leur développement, les bactéries produisent des phosphatases, qui, en attaquant les phospholipides présents dans le milieu, les

transforment en des substances plus assimilables par les bactéries, et ces substances étant hydrosolubles, échappent à l'extraction par les solvants organiques.

Cette hypothèse est appuyée par le fait suivant : au cours d'incubations prolongées, nous constatons une augmentation du phosphore lipidique, donc un abaissement du taux de dégradation de ceux-ci. L'explication que nous proposons est basée sur le métabolisme interne des bactéries lactiques. Les produits de dégradation des phospholipides du lait, une fois absorbés par la bactérie, sont retransformés en phospholipides bactériens. De cette façon, dans les extractions des échantillonsensemencés, le phosphore lipidique représente en même temps celui du lait et celui des bactéries lactiques qui sont alors présentes en nombre considérable.

Si nous faisons une représentation graphique de l'évolution du phosphore lipidique en fonction du temps dans les échantillonsensemencés (tableau **XXVIII**), nous pourrions imaginer que la courbe expérimentale (courbe A) serait la somme de deux courbes : courbe de dégradation des phospholipides du lait (courbe B) et courbe de la synthèse des phospholipides des bactéries lactiques (courbe C). (Fig. **12**)

B. ÉVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES DU SÉRUM DU BEURRE ENSEMENCÉ PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES.

Pour montrer la nature des fractions dégradées sous l'action des bactéries lactiques, nous avons été amené à travailler sur une matière première plus riche en phosphatides que le lait. Nous avons déjà remarqué dans le cas de l'analyse des lipides du lait de brebis que la séparation des phospholipides

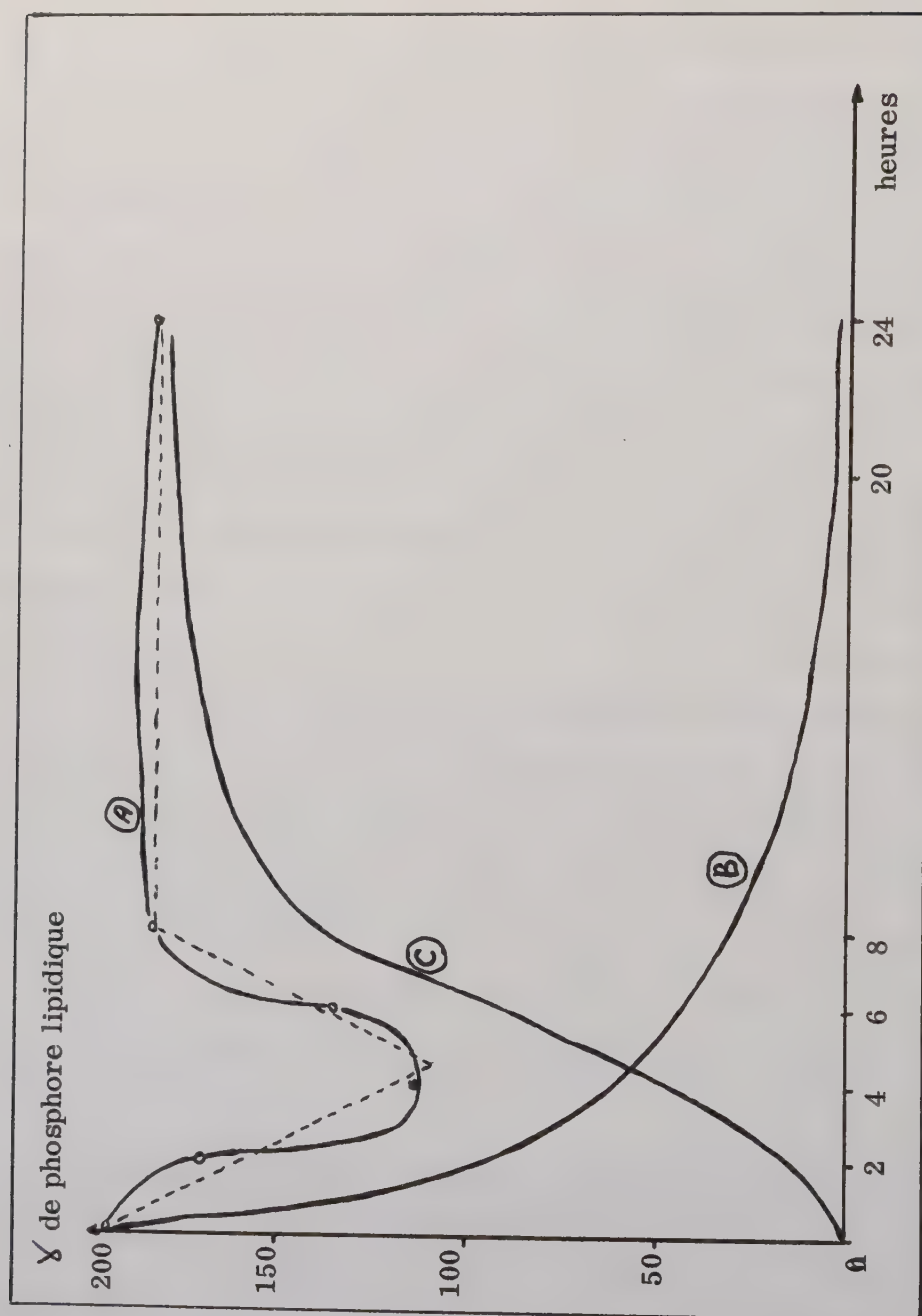


Fig. 12

de grandes quantités de triglycérides n'était pas satisfaisante et que le traitement des lipides à deux reprises par de l'acétone à 0° ne supprime qu'à peu près 13 % des lipides neutres et que ceux-ci contiennent plus de 14 % du phosphore lipidique total. (43)

Nous avons décidé d'utiliser le procédé normal de fabrication du beurre comme un moyen de rejeter la plupart des constituants superflus du lait.

Les phospholipides du lait, faisant partie de la membrane qui entoure les globules gras, près de 70 % des phospholipides totaux restent avec la crème lors de sa séparation. (38) La plupart de ces phospholipides, près de 45 % du total, passent dans la phase aqueuse - le babeurre - lorsque l'émulsion de crème (émulsion type huile dans l'eau) est détruite par le barattage. (1, 10 et 43)

Le reste des phosphatides de la crème, près de 25 %, peut être récupéré du sérum du beurre par centrifugation du beurre fondu.

Quoi qu'il en soit, une proportion considérable des phospholipides totaux (30 % environ) restant avec le lait écrémé, est probablement dérivée des membranes des globules gras plus petits qui échappent à la séparation par centrifugation, et des microsomes ou des particules de lipoprotéines dans le plasma du lait. (36)

Nous avons centrifugé 10 litres de lait pasteurisé du commerce pendant 10 minutes à 2 500 tours / minute.

La crème séparée est centrifugée de nouveau pendant 15 minutes à 5 000 tours / minute pour éliminer au maximum le lait restant avec la crème. Nous obtenons ainsi 360 g de crème que nous faisons baratter par agitation dans un grand erlenmeyer. Il a été nécessaire d'ajouter près de 10 % d'eau froide pour aider la séparation des deux phases (4). Après le malaxage manuel nous obtenons environ 330 g de beurre. La phase aqueuse (le babeurre)

est évaporée sous vide à 35 - 40° C. La masse pâteuse obtenue est diluée dans l'eau, ajustée à 50 ml, et stérilisée aussitôt après à 115 - 120° C pendant 15 à 20 minutes.

Le beurre a été fondu et centrifugé à 50° C (34, 44). La phase supérieure, l'huile de beurre, ne contient que des traces de phosphore (40, 21). Le sérum du beurre est séparé par décantation et siphonnage, nous obtenons ainsi 100 ml de sérum qui sont stérilisés aussitôt après à 115 - 120° C, pendant 15 à 20 minutes.

Le taux de phosphore lipidique de babeurre est 0,51 % et celui de sérum du beurre 0,68 %, c'est donc sur ce dernier que nous allons effectuer les essais d'incubation et le fractionnement des phospholipides.

Nous employons une souche liquide de ferments lactiques très riche en *Streptococcus lactis*, fournie par les Etablissements Proseca; 0,1 ml de cette souche est utilisé pour l'ensemencement de 5 ml du sérum de beurre contenu dans des tubes à essais bouchés au coton.

Après incubation à 37° C pendant des temps variés (0, 4, 6, 8 et 24 heures) les lipides sont extraits par épuisement du sérum avec le mélange extracteur benzène - éthanol 200/50 V/V pendant 1 heure selon le procédé azéotropique. Après la purification croisée de FOLCH (15), une partie des lipides est utilisée pour le dosage de phosphore et l'autre partie est fractionnée sur colonne d'acide silicique.

Les résultats des incubations sont réunis dans le tableau **XXXX**.

La dégradation des phospholipides du sérum du beurre est apparemment moins prononcée que celle du lait, et il semble que le taux de dégradation ne soit pas en rapport direct avec la quantité de phospholipides présents dans le milieu.

TABLEAU **XXIX**

	0		4 heures		6 heures		8 heures		24 heures	
	T	F	T	F	T	F	T	F	T	F
mg de lipide /5 ml de sérum	186,3	185	186,8	186	186	185	186	185,5	180	176 ?
mg de phosphore /g de lipide	1,290	1,285	1,280	1,265	1,280	1,170	1,250	1,150	1,230	1,140
% dégradation	0 %		1,1 %		8,5 %		8 %		7,3 %	

1° Analyse des lipides non dégradés

Nous avons fractionné les lipides provenant des essais témoins (dans lesquels les phospholipides n'ont pas subi l'action enzymatique des bactéries lactiques) sur colonne d'acide silicique comme dans les cas précédents.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau **XXX**.

2° Analyse des lipides dégradés

Les lipides provenant des incubations du sérumensemencé par des ferments lactiques ont été fractionnés sur colonne d'acide silicique.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau **XXXI**

TABLEAU **XXX**

Fractionnement des lipides non dégradés du sérum du beurre

ÉLUANTS	POIDS		PHOSPHORE		GROUPES
	mg	%	mg	%	
I Cl ₃ CH pur	149	70,11	0,32	0,02	Lipides neutres
II " + 5 % CH ₃ OH	20,7	9,74	109,71	8,4	Lipides neutres + Acides phosphatidiques
III " + 20 % "	12,0	5,55	300,0	22,9	Céphalines + Lécithines
IV " + 40 % "	7,2	3,38	196,34	14,6	Lécithines + Lysolécithines
V " + 60 % "	10,7	5,03	325,65	24,0	Lécithines + Lysoléci- thines + Sphingomyélines
VI " + 80 % " + 4 % d'eau	12,9	6,07	395,00	30,12	Lécithines + Sphingomyélines
Total récupéré	212,5		1327,02		
Total appliqué	213,4		1399,66		
Rendement	94,8		94,8		

Par la chromatographie sur couche mince, nous trouvons 7 taches qui sont identifiées d'après leurs R_f et par les réactifs appropriés comme dans les cas précédents. (PLANCHE ■ ■ Fig. 1)

TABLEAU **XXXI**

Fractionnement des lipides dégradés du sérum du beurre

ÉLUANTS	POIDS		PHOSPHORE		GROUPES
	mg	%	mg	%	
I Cl ₃ CH pur	123,1	76,30	5,20	0,5	Lipides neutres
II " + 5 % CH ₃ OH	5,3	3,28	86,10	8,7	Acides phosphatidiques
III " + 20 % "	12,3	7,63	280,44	28,4	Céphalines
IV " + 40 % "	3,4	2,11	86,02	8,7	Céphalines + Lécithines
V " + 60 % "	8,2	5,08	202,70	20,5	Lécithines + Lysolécithines
VI " + 80 % " 4 % d'eau	9,3	5,75	327,36	33,1	Lécithines + Sphingo- myélines
Total récupéré	161,6		987,82		
Total appliqué	161,8		1004,47		
Rendement	99,87		98,83		

8 taches ont été révélées et identifiées sur la plaque de chromatographie en couche mince. Elles sont représentées sur la Fig. 2 PLANCHE ■■.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

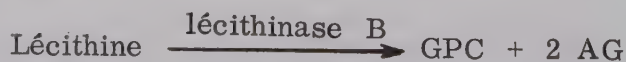
Dans le cas du sérum du beurre nous constatons tout d'abord une légère diminution du phosphore lipidique des essais témoins. Ceci serait dû à l'action de l'incubation, comme l'avaient observé J. ÉTIENNE et J. POLONOVSKI (13) lors de l'incubation du sérum sanguin. Cette dégradation est progressive, de 1,28 mg pour 5 ml de sérum du beurre au temps 0 à 1,23 mg après 24 heures.

La courbe de dégradation des phospholipides du sérum de beurreensemencé paraît avoir à peu près la même allure que celle du lait stérilisé, sauf qu'ici le rapport des phospholipides hydrolysés aux phospholipides totaux est moins grand. Ceci rend délicate l'étude des fractions dégradées par la méthode chromatographique de fractionnement et identification des différents groupes de phospholipides.

En effet, sur les résultats obtenus par cette méthode, nous ne pouvons pas préciser la ou les fractions qui sont dégradées. Cependant, nous constatons l'apparition d'une tache correspondant aux acides gras libres (Fig. 2 - PLANCHE ■ ■ - spot n° 7) qui est absente dans le cas des essais témoins. La lécithine est surtout attaquée et son taux de dégradation atteint 30 à 40 %. Les céphalines aussi sont touchées, mais leur taux de dégradation n'est pas aussi important que celui des lécithines.

Une étude plus approfondie serait nécessaire par l'identification des produits de dégradation, dosage de choline lipidique, choline libre et choline hydrosoluble combinée, pour préciser la marche des opérations.

Cependant nous supposons que la présence d'acides gras libres après incubation, des sérumsensemencés, serait due à leur libération sous l'influence de la lécithinase B. Dans ce cas, il est fort probable que la fraction libérée soit la glycérylphosphorylcholine.



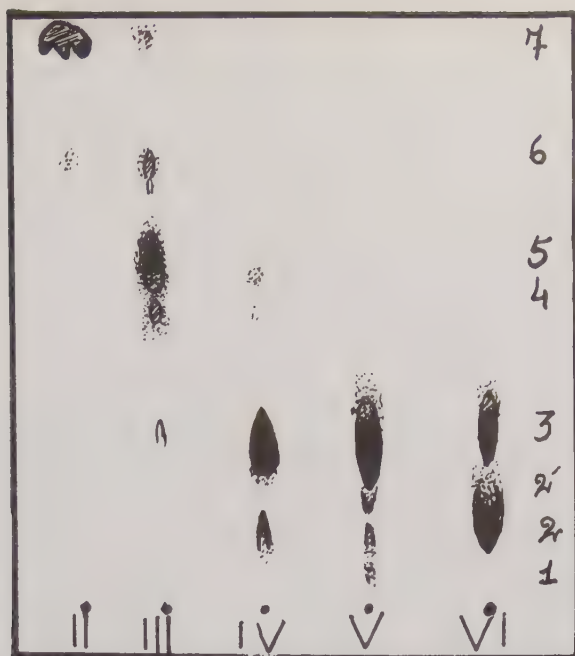


Fig. 1 Lipides non dégradés

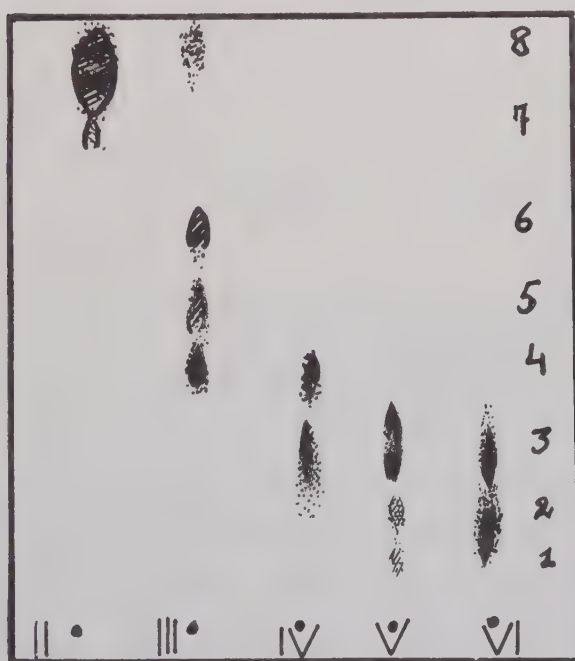


Fig. 2 Lipides dégradés

PLANCHE ■ ■ CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

"Lipides du sérum du beurre"

Système : chloroforme - méthanol - eau 65 / 25 / 4 V / V
Révélation à l'iode.

DISCUSSION GÉNÉRALE

D'après l'analyse des lipides du lait de brebis, du caillé et du fromage de Roquefort, nous constatons une baisse du phosphore lipidique qui est due à la dégradation des phospholipides par les bactéries lactiques, ainsi que nous l'avons montré dans le CHAPITRE III.

Le taux des phospholipides totaux par rapport à la matière grasse du lait de brebis, du caillé et du fromage de Roquefort a été comparé dans le tableau **XXIII**. Ce taux passe de 0,71 % des lipides du lait de brebis à 0,45 % de ceux du fromage de Roquefort.

D'après la courbe d'évolution de la flore lactique dans les fromages (Fig. **11**), le maximum du taux de développement bactérien n'est atteint qu'au bout du 4^{ème} ou 5^{ème} jour après la fabrication. Il paraît donc normal que le taux des phospholipides du caillé dosés le jour même de la fabrication (0,70 %) ne soit pas très différent de celui du lait de brebis, les ferments lactiques n'ayant pas eu assez de temps pour commencer la dégradation des phospholipides.

L'opération du salage des fromages frais qui se fait au bout de la première semaine de fabrication du fromage élimine brusquement les ferments lactiques; ce qui nous amène à supposer que la dégradation essentielle n'est effectuée qu'au cours de la première semaine de fabrication.

D'après les chromatographies sur colonne et sur couche mince d'acide silicique, nous constatons que la dégradation des lécithines dans le fromage est presque totale (PLANCHE ■ Fig. 4). La fraction céphalinique (céphalines et acides phosphatidiques) semble aussi être fortement dégradée, cependant les phospholipides du fromage de Roquefort ne sont constitués que par des céphalines et des acides phosphatidiques et une faible fraction de sphingomyéline.

Il est à remarquer que les phospholipides du fromage de Roquefort affiné sont aussi ceux du *Penicillium roquefortii* qui s'est développé au sein du fromage. Nous avons vu que son taux moyen de phosphore lipidique (0,5 %) est supérieur à celui du lait (0,03 %) et des ferments lactiques (0,17 %), ce qui pourrait expliquer l'existence de phospholipides malgré la dégradation de ceux du lait de brebis par les ferments lactiques, et la dégradation des phospholipides de ces derniers après leur élimination sous l'action du salage.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

L'étude des phospholipides du lait et de ses produits implique l'application d'une méthode d'extraction des lipides qui soit capable d'extraire, à côté des grandes quantités de lipides neutres, les fractions phosphorées qui sont intimement liées aux protéines pour former la membrane des globules gras. Il faut donc qu'une bonne méthode d'extraction arrive à rompre ces cénapses lipoprotéiques pour libérer les phospholipides.

Parmi les solvants organiques employés pour l'extraction des lipides, il n'y a que les solvants polaires (éthanol, méthanol, etc...) qui soient capables d'accomplir ce rôle d'intermédiaire entre le solvant apolaire et les lipides polaires.

Dans ce but, nous avons choisi le système eau-alcool-benzène qui a été mis au point, et est employé dans notre Laboratoire pour l'extraction des lipides de la bile, du tourteau d'arachide, de la levure, etc... La comparaison des résultats obtenus avec ceux obtenus par les méthodes classiques d'extraction des lipides, a prouvé la supériorité de la méthode d'extraction par le mélange azéotropique eau - alcool - benzène.

Notre étude quantitative a porté systématiquement sur la poudre du lait entier à 28 % de M.G., de lait demi-écrémé à 12 % de M.G., et de lait

écrémé à 0,7 % de M.G., ainsi que sur le lait concentré sucré, le lait stérilisé homogénéisé et le fromage de Roquefort.

D'une façon générale, nos méthodes d'extraction à chaud ou à froid, sont plus efficaces que les méthodes classiques d'extraction des lipides : FOLCH, KUMAGAWA, ROSE - GOTTLIEB, F.I.L. n° 5, ainsi que la méthode proposée par NAVELLIER & BRUNIN.

D'autre part, par l'application du système eau - alcool - benzène à froid, nous arrivons à extraire davantage de lipides que par la méthode azéotropique à chaud, et inversement, avec cette dernière méthode on extrait plus de phosphore lipidique (0,027 %) que par la première (0,022 % en moyenne). Cette différence serait due, supposons-nous, au partage des phospholipides entre les deux phases hydro-alcoolique et alcool-benzénique dans le cas de la méthode à froid qui ferait passer une partie des phospholipides dans la phase inférieure (hydro-alcoolique). La quantité de phospholipides du lait n'étant d'ailleurs pas élevée, la récupération et l'étude de la partie se trouvant dans la phase inférieure hydro-alcoolique est très délicate.

Pour une étude quantitative, la méthode d'extraction à froid est à conseiller; mais pour l'étude des phospholipides du lait et de ses produits, nous choisirons l'épuisement azéotropique à chaud, vu son rendement élevé en phosphore lipidique extrait.

Le fromage de Roquefort et les différents ingrédients entrant dans sa fabrication, c'est-à-dire le lait de brebis, la poudre de ferments lactiques et de *Penicillium roquefortii*, ainsi que le caillé frais et le lactosérum sont analysés. L'abaissement du taux de phosphore lipidique, et l'absence des spots correspondant aux lécithines sur la chromatographie en couche mince des lipides du fromage affiné a révélé une dégradation des phospholipides au cours de la fabrication et de la maturation. Nous nous sommes donc proposé d'étudier la cause de ce phénomène, et le moment exact où la dégradation a lieu.

En premier lieu, nous avons étudié l'effet des bactéries lactiques sur les phospholipides du lait. Le lait stérilisé ensemencé par les bactéries lactiques a été incubé à 37° C, pendant des temps variables au bout desquels les lipides sont extraits, et le phosphore lipidique est dosé.

En effet, une diminution du phosphore lipidique est observée. Elle atteint son maximum après 4 à 6 heures d'incubation, mais par la suite, elle tend à disparaître et le taux de phosphore lipidique augmente jusqu'au voisinage du taux initial. Parmi les hypothèses que l'on pouvait formuler à cet égard, nous en avons retenu une qui paraît expliquer le phénomène d'une façon acceptable. Nous supposons que les phospholipides du lait initial sont hydrolysés pendant la phase de latence de croissance des bactéries lactiques, sous l'action des lécithinases produites par ces dernières, pour former des produits hydro-solubles assimilables par les bactéries, à la suite de quoi ils seront absorbés et anabolisés en phospholipides bactériens. On peut concevoir que la courbe schématique de la synthèse des phospholipides bactériens soit superposable à la courbe de croissance des bactéries lactiques.

En ce qui concerne le fromage de Roquefort et le moment où la dégradation a lieu, nous croyons qu'il se situe avant le salage du fromage frais, c'est-à-dire là où les ferments lactiques ont le maximum d'activité vitale, de sorte que, une fois les bactéries éliminées, sous l'effet du sel, il ne restera pas beaucoup de phospholipides intacts. Dans le fromage de Roquefort, les lécithines sont presque totalement dégradées, et il est probable que les céphalines et les acides phosphatidiques qui sont les constituants essentiels des phospholipides du fromage de Roquefort, appartiennent non pas au lait de brebis ou aux ferments lactiques, mais au *Penicillium roquefortii* développé au sein du fromage. La sphingomyéline proviendrait du lait de brebis car le *Penicillium* en est presque dépourvu. Ceci est confirmé par le fait que la sphingomyéline est peu dégradée par les lécithinases sécrétées par les bactéries lactiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALAIS C. - "Science du lait". 2^{ème} éd. 1965, Sep éd.
2. Analyse physique et chimique du lait - Méthodes officielles. Journal Officiel, 23 Avril 1954.
3. ARIZZI M. - "Contribution à l'étude de l'extraction des lipides de la levure". Diplôme d'Etudes Supérieures. Montpellier, 1965.
4. BALIGA B.S. et BASU K.P. - Indian. J. Dairy Sci. 1955, 8, 119; 1956, 9, 24; 1956, 9, 95.
5. BORDAS F. et RACZKOWSKI S. - C.R. Ac. Sc., 1902, 19, 311.
6. BREGOFF M., ROBERTS E. et DELWICH E. - J. Biol. Chem., 1953, 205, 127.
7. CLEMENT J. et DISCOSTANZO G. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 127.
8. COURTOIS J.E. et PERLES R. - "Précis de chimie biologique". Tome II, Masson éd., 1965.
9. CRANE J.C. et HORRALL B.E. - J. Dairy Sci., 1942, 8, 651.
10. CUSICK J.T. - Cornell. Univ. Agric. Exp. State. Mem., n° 30, 1920.
11. DELSAL J.L. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 269, 99.

12. DUTHEIL H. - "Recherche sur la microbiologie du lait de brebis et du fromage de Roquefort". Diplôme d'Etudes Supérieures, Paris, 1954.
13. ETIENNE J. et POLONOVSKY J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 813; 1960, 857; 1963, 561.
14. FELDMANN G.L., FELDMANN L.S. et ROUSER G. - J. A.O.C.S., 1965, 42, 742.
15. FOLCH J., LEE M. et SLOANE-STANLY G.M. - J. Biol. Chem., 1957, 226, 497.
16. FRANKEL E.N., SMITH L.M. et JACK E.L. - J. Dairy Sci., 1958, 41, 483.
17. GALANOS D.S. et KAPOULAS V.M. - Biochem. Biophys. Acta, 1965, 98, 278.
18. GALANOS D.S. et KAPOULAS V.M. - Biochem. Biophys. Acta, 1965, 98, 293.
19. HAWKE J.C. - J. Dairy Res., 1963, 33, 255.
20. HEBANT-JODER A.M. - "Extraction des lipides de la bile". Diplôme d'Etudes Supérieures, Montpellier, 1964.
21. JACK E.L. et SMITH L.M. - J. Dairy Sci., 1956, 39, 1.
22. JACQUET J. et THEVENOT R. - "Le lait et le froid". Ed. J.B. Baillière & Fils, Paris, 1961.
23. JENNES R. et PATTON S. - "Principles of Dairy Chemistry" pages 30 et 265. J. Wiley and Sons, 1959.
24. KAHANE E. - J. Pharm. Chim., 1943, 19, 26.
25. KAHANE E. et LEVY J. - "Le Lait". 1945, 247 et 248, 193-223.
26. KAHANE E. et ROUS S. - "Enzymes of lipid metabolism". Pergamon Press, 1961, p. 82.

- 26 (bis) - KAHANE E. et MERCIER H. - Revue française des corps gras.
1964, 12, 671.
27. KING N. - "The milk fat globule membrane" p. 25. Commonwealth
Agricultural bureau, Farham Royal, Bucks. England, 1955.
28. LEBRETON E. et PANTALEON J. - Exp. Ann. Bioch. Méd., 1947,
7, 111.
29. LECOQ R. - "Manuel d'analyse alimentaire et d'expertises usuelles".
Ed. Doin, tome II, 1022 et 1021.
30. LEMELAND M.P. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1921, 4, 134.
31. MACHEBOEUF M. - "Etat des lipides dans la matière vivante". Ed.
Herman, Paris, 1937.
32. MACHEBOEUF M. et DELSAL S. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1943,
25, 116.
33. MARINETTI G.V. et ERBLAND J. et KOCHEN J. - Fed. Proc.,
1957, 16, 837.
34. MC. DOWELL A.K.R. - J. Dairy Res., 1958, 25, 2 : 192; C.A.,
1958, 52, 20720.
35. MERCIER H. - "Contribution à l'étude de l'extraction des lipides du
tourteau d'arachide déshuilé et de la bile". Diplôme d'Etudes
Supérieures, Montpellier, 1963.
36. MORTON R.K. - Biochem. J. 1954, 57, 231.
37. NAVELLIER P. et BRUNIN R. - Ann. Fals. Fraudes, 1960, 379.
38. PERLMAN J.L. - J. Dairy Sci., 1935, 18, 113.
39. PERLMAN J.L. - J. Dairy Sci., 1935, 18, 125.
40. PONT E.G. - J. Dairy Res., 1925, 19, 316.
41. PROMAYON J. - "Sur les lipides hydrophiles de l'arachide". Thèse
de Doctorat Spécialité, Montpellier, 1966.

42. REWALD B. - Le lait. 1937, 17, 225.
 43. RHODES D.N. et LEA C.H. - J. Dairy Res., 1958, 25, 60.
 44. RHODES D.N. et LEA C.H. - Biochem. J., 1957, 65, 526.
 45. RÖSE-GOTTLIEB. - "Official methods of analysis". 9^{ème} ed. A.O.A.C.
Washington, 1960, 15029.
 46. RÖSE-GOTTLIEB. - "Manuel d'analyses alimentaires". Ed. Doin,
Tome II, 1210.
 47. ROUSER G., GALLIC, LIEBER, BLANK M.L. et PRIVETTOS.
A.O.A.C., 1964, 41, 215.
 48. SMITH L.M. et FREEMAN N.K. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 1450.
 49. SMITH L.M. et JACK E.L. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 767.
 50. SMITH L.M., LOWRY R.R. et JACK E.L. - J. Dairy Sci., 1959,
42, 552.
 51. SMITH L.M. et LOWRY R.R. - J. Dairy Sci., 1962, 45, 581.
 52. Société des Caves de Roquefort, Comité de recherches, "Mise au point
d'un test lipolytique", déc. 1965.
 53. STONE M.J. - J. Dairy Res., 1952, 19, 311.
 54. STONE M.J. et ROWLANDS A. - J. Dairy Res., 1952, 19, 51.
 55. STUDER P. - "Contribution à l'étude des laits de brebis du bassin
laitier de Roquefort, utilisés pour la fabrication de ce fromage".
Monographie : M.N.I.L. Aurillac.
 56. TOMATSCHEF. - Hoppe Seylers Med. Chem. Untersuchungen, 1867,
2, 272; d'après Le lait, 1937, 163, 225.
 57. WALSTRA P. et MULDER H. - Neth. Milk. & Dairy J., 1962, 16, 172.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Page
<u>INTRODUCTION</u>	9
Première Partie	
EXTRACTION QUANTITATIVE	13
CHAPITRE I <u>TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES</u>	15
CHAPITRE II <u>ÉTUDE DU LAIT</u>	23
A. Lait en poudre entier (28 % M. G.)	23
B. Lait en poudre partiellement écrémé (12 % M. G.)	27
C. Lait en poudre écrémé (0,7 % M. G.)	29
D. Lait concentré sucré	30
CHAPITRE III <u>ÉTUDE DU LAIT STÉRILISÉ</u>	33
CHAPITRE IV <u>ÉTUDE DU FROMAGE DE ROQUEFORT</u>	43
Deuxième Partie	
ÉVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES A PARTIR DU LAIT DANS LES FROMAGES (Cas du fromage de Roquefort)	49
CHAPITRE I <u>GÉNÉRALITÉS ET DÉFINITIONS</u>	51
CHAPITRE II <u>LE FROMAGE DE ROQUEFORT ET SA FABRICATION</u>	57
A. Le lait de brebis	60
B. Les levains lactiques	66
C. La présure	72
D. Le <i>Penicillium roquefortii</i>	73
E. Le caillage et le caillé frais	80
F. Extraction et analyse des lipides du fromage de Roquefort	87
G. Discussion	90

CHAPITRE **III**

A.	ÉVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES DU LAIT ENSEMENCÉ PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES	93
●	Discussion.....	96
B.	ÉVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES DU SÉRUM DU BEURRE ENSEMENCÉ PAR DES BACTÉRIES LACTIQUES	97
●	Interprétation des résultats	104
<u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u>		105
<u>RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS</u>		107
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		111

DEUXIÈME THÈSE

VU et PERMIS d'IMPRIMER

MONTPELLIER, le

Le Recteur de l'Académie
de Montpellier,

VU et APPROUVÉ

MONTPELLIER, le

Le Doyen de la Faculté
des Sciences,

POLY - OFFSET

36, Rue de Porto
MONTPELLIER
